
**Zum Mechanismus der
2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus
*Clostridium symbiosum***

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Marc Hetzel
aus Dernbach/Ww

Marburg/Lahn 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 1999 bis April 2004 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Buckel durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Buckel
Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Das größte Hindernis auf dem Weg
zur Erkenntnis
ist nicht die Dummheit,
es ist die Illusion des Wissens.
Daniel J. Boorstin

Die im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Selmer, T., Willanzheimer, A. & Hetzel, M. (2002) Propionate CoA-transferase from *Clostridium propionicum*. Cloning of gene and identification of glutamate 324 at the active site. *Eur J Biochem.*, **269**, 372-380.

Hans, M., Bill, E., Cirpus, I., Pierik, A.J., Hetzel, M., Alber, D. & Buckel, W. (2002) Adenosine triphosphate-induced electron transfer in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Biochemistry*, **41**, 5873-5882.

Hetzel, M., Brock, M., Selmer, T., Pierik, A.J., Golding, B.T. & Buckel, W. (2003) Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. *Eur J Biochem.*, **270**, 902-910.

Kim, J., Hetzel, M., Boiangiu, C.D. & Buckel, W. (2004) Dehydration of (*R*)-2-hydroxyacyl-CoA to enoyl-CoA in the fermentation of α -amino acids by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **im Druck**.

Buckel, W., Hetzel, M. & Kim, J. (2004) ATP driven electron transfer in enzymatic radical reactions. *Current Opinions in Chemical Biology*, **im Druck**.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung

Einleitung

1	<i>Acidaminococcus fermentans</i> und <i>Clostridium symbiosum</i>	1
2	Anaerober Glutamatabbau	4
3	(<i>R</i>)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	8
4	Bekannte Kofaktoren der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase und deren mögliche Rolle	11
5	Mechanismus der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	18
6	Zielsetzung der Arbeit	21

Material und Methoden

1	Verwendete Materialien	
1.1	Chemikalien und Biochemikalien	22
1.2	Gase	22
1.3	Säulenmaterial, Fertigsäulen und Geräte	22
1.4	Bakterien	
1.4.1	<i>A. fermentans</i>	23
1.4.2	<i>C. symbiosum</i> HB 25	24
1.4.3	<i>Escherichia coli</i> XL1-blue MRF'	24
2	Biochemische Methoden	
2.1	Reinigung der Komponente D aus <i>C. symbiosum</i> und <i>A. fermentans</i>	25
2.2	Alternative Reinigungsmethode der Dehydratase aus <i>C. symbiosum</i>	26
2.3	Test der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	
2.3.1	Gekoppelter Aktivitätstest	27
2.3.2	Direkter Aktivitätstest	28
2.4	Reinigung der Hilfsenzyme für den gekoppelten Aktivitätstest	
2.4.1	Reinigung des Enzympools aus <i>A. fermentans</i>	29
2.4.2	Aktivitätsbestimmungen der CoA-Transferasen	30
2.4.3	Reinigung der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase	30
2.4.4	Aktivitätsbestimmung der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase	31

2.5	Der Effekt von Metronidazol auf das Dehydratasesystem	32
2.6	Synthese und Reinigung von rekombinanter Komponente A aus <i>A. fermentans</i>	32
2.7	Proteinbestimmung	
2.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford	33
2.7.2	Proteinbestimmung nach Pierce	33
2.8	Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen	34
2.9	Bestimmung von säurelabilem Schwefel	34
2.10	Jodometrische Bestimmung der Sulfidkonzentration	35
2.11	Bestimmung von Flavinen	35
2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.13	Synthese von CoA-Estern	
2.13.1	Synthese von Acetyl-CoA und Glutaryl-CoA	37
2.13.2	Synthese von (<i>R</i>)-2-Hydroxyglutaryl-CoA	37
2.13.3	Synthese von (<i>E</i>)-Glutaconyl-CoA	38
2.14	Bestimmung der Konzentration von CoA-Estern mit gekoppeltem DTNB-Test	38
2.15	Bestimmung der K_m -Werte für (<i>R</i>)-2-Hydroxyglutaryl-CoA und (<i>E</i>)-Glutaconyl-CoA	39
2.16	Bestimmung der ATPase-Aktivität der Komponente A	40
2.17	Bestimmung des Molybdängehaltes von Komponente D	
2.17.1	Chemische Bestimmung	41
2.17.2	Physikalische Bestimmung	42
2.18	Isolierung eines putativen molybdänhaltigen Kofaktors aus Komponente D	42
2.19	Charakterisierung des putativen molybdänhaltigen Kofaktors aus Komponente D	
2.19.1	Charakterisierung mittels HPLC und UV-vis Spektroskopie	43
2.19.2	Charakterisierung mittels Fluoreszenz-Spektroskopie	43
2.20	Darstellung eines AlF_4^- -induzierten Komplexes der Komponente D und Komponente A	
2.20.1	Aufreinigung und Charakterisierung des Komplexes mittels Gelfiltration, Nativgel und SDS-PAGE	44

2.20.2	Aktivitätsbestimmung des AlF_4^- -induzierten Komplexes der Komponente D und Komponente A	45
2.20.3	EPR-Experimente mit Komponente D, Komponente A und AlF_4^- -induziertem Komplex beider Komponenten	46
2.21	Ansätze zur Kristallisation der Komponente D aus <i>C. symbiosum</i>	46
2.22	Ansätze zur Kristallisation des AlF_4^- -induzierten Komplexes der Komponente D und Komponente A aus <i>C. symbiosum</i> und <i>A. fermentans</i>	47

Ergebnisse

1	Aufzucht von <i>Clostridium symbiosum</i>	48
2	Reinigung der Komponente D aus <i>C. symbiosum</i> und <i>A. fermentans</i>	48
3	Eigenschaften der Komponente D aus <i>C. symbiosum</i>	
3.1	Untersuchungen zum Metallgehalt der Komponente D aus <i>C. symbiosum</i>	51
3.2	Isolierung und erste Untersuchungen eines putativen Kofaktors der Komponente D aus <i>C. symbiosum</i>	53
3.3	UV-vis Spektrum des Überstandes von TCA-gefällter Komponente D aus <i>C. symbiosum</i>	56
4	Reinigung der rekombinanten Komponente A aus <i>A. fermentans</i> mit StrepTactin-Affinitätschromatographie	57
5	Optimierung des Aktivitätstests	
5.1	Gekoppelter Aktivitätstest	57
5.2	Direkter Aktivitätstest	59
5.3	Effekt von Metronidazol auf das Dehydratasesystem	61
6	ATPase-Aktivität der Komponente A	62
7	Darstellung des Aluminiumtetrafluorid-induzierten Komplexes aus Komponente D und Komponente A	63
8	Aktivitätsmessungen des Aluminiumtetrafluorid-induzierten Komplexes	66
9	EPR-Messungen mit Komponente D, Komponente A und Aluminiumtetrafluorid-induziertem Komplex	67
10	Kristallisation des Aluminiumtetrafluorid-induzierten Komplexes aus Komponente D und Komponente A	71
11	Kristallisation und Struktur der beta-Untereinheit der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	72

Diskussion	75
Literaturverzeichnis	83

Abkürzungsverzeichnis

DTE	Dithioerythritol
DTNB	5, 5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektronen Paramagnetische Resonanz
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FMN	Riboflavin-5'-phosphat
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
Maldi-TOF MS	Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
OD	Optische Dichte
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride
RP	Reversed Phase
SDS	Sodium dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetraethylethylendiamin
TCA	Trichloroaceticacid (Trichloressigsäure)
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
UV-vis	Ultraviolett visible

Zusammenfassung

Das 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-System ist das Schlüsselenzym in der Fermentation von Glutamat zu Acetat, Butyrat, CO₂ und H₂ durch *Clostridium symbiosum* und *Acidaminococcus fermentans*. Die Dehydratase katalysiert die syn-Dehydratisierung von (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA zu (E)-Glutaconyl-CoA. Diese Dehydratisierung ist seit Jahren von großem mechanistischem Interesse, da ein nicht azides Proton ($pK_s = 40$) am C-3 des (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA abstrahiert werden muss. In der vorliegenden Arbeit wurden biochemische und spektroskopische Untersuchungen dieses Enzymsystems bzw. Katalysemechanismuses durchgeführt, um weitere Einblicke in Reaktion und Elektronenfluss zu erhalten.

Die Reinigungsmethoden für Komponente D aus *Clostridium symbiosum* wurden weiter verbessert und erneute Charakterisierungen der Kofaktoren durchgeführt. Trotz Hinweise auf eine Beteiligung eines d^1 -Metalls am Katalysemechanismus konnten nur Spuren (10 %) von Molybdän in Komponente D als auch ein nicht weiter identifizierter „Molybdänkofaktor“ nachgewiesen werden. Durch die Einführung einer neuen Aktivitätsbestimmung der Komponente D konnte durch nicht-äquimolare Mischungen aus Komponente A und Komponente D der Beweis erbracht werden, dass nur substöchiometrische Mengen an Komponente A zur maximalen Aktivität gebraucht werden. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem postulierten Mechanismus tatsächlich um einen katalytischen Mechanismus handelt.

Durch die Bildung eines AlF_4^- -induzierten Komplexes der Komponenten A und D in Anwesenheit von ATP konnte die Interaktion und den durch ATP-Hydrolyse getriebenen Elektronentransfer von Komponente A nach Komponente D gezeigt werden. Die bisher in der Komponente D gefundenen Kofaktoren ($[4Fe-4S]^{2+}$ Cluster und FMNH₂) zeigen keine Änderungen ihrer Redoxzustände in Anwesenheit von Komponente A und ATP. Durch die erfolgreiche Kristallisation sowohl von Komponente D als auch von AlF_4^- -induziertem Komplex der Komponenten A und D könnten nähere Informationen über Lage und Koordination der Kofaktoren zum aktiven Zentrum geben. Durch die Lösung der 3D-Struktur der β -Untereinheit der Komponente D konnte ein ungewöhnlicher $[4Fe-4S]$ Cluster erkannt werden, der durch 3 Cysteine (Cys 74, 101 und 332) und 1 Tyrosin (Tyr 37) koordiniert ist. An dieser Koordination sind die drei strikt konservierten Cys-Reste der *hgdB*-Sequenz beteiligt. Der Tyr-Rest ist hingegen nicht konserviert und wird als „Parkplatz“ des – am postulierten Katalysemechanismus beteiligten – Ketylradikals diskutiert.

Einleitung

1 *Acidaminococcus fermentans* und *Clostridium symbiosum*

Bis in die 90er Jahre wurde unter der Gattung *Clostridium* anaerobe, gram-positive Stäbchen, die thermoresistente Endosporen ausbilden können und nicht zur dissimilatorischen Sulfatreduktion befähigt sind, eingeordnet. Aufgrund dieser wenig restriktiven Charakteristika stellt diese Gattung eine sehr heterogene Gruppe von Bakterien dar, welche sich in einer sehr grossen phylogenetischen und phänotypischen Diversität äußert.

Mitte der 90er Jahre wurden die *Clostridien* anhand der 16S rRNA-Analyse in mindestens 19 sogenannte Cluster unterteilt (Collins et al., 1994), in die auch Kokken, Nicht-Sporenbildner und sogar Gram-negative Organismen aufgenommen wurden. Diese Einordnung findet auch weiterhin Anwendung; allerdings ist die Klassifizierung noch lange nicht abgeschlossen und wird auch in Zukunft noch überarbeitet werden müssen. Als maßgebliche Referenz gilt die „Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria.“ in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 1. Demnach wird heutzutage wieder eine „klassische“ Einteilung vorgenommen. Die Domäne *Bacteria* unterteilt sich in 23 Stämme, wobei unter Stamm XIII *Firmicutes* die Klasse der *Clostridia* zu finden ist. Unter der Klasse der *Clostridia* wird die Ordnung der *Clostridiales* mit acht Familien geführt, zu der die beiden Familien *Clostridiaceae* und *Acidaminococcaceae* gehören. Als Vertreter der *Acidaminococcaceae* finden sich fünfzehn Gattungen, Gattung I *Acidaminococcus* enthält als einzige Spezies *Acidaminococcus fermentans*. Die Familie der *Clostridiaceae* umfasst dreizehn Gattungen, unter anderem Gattung I *Clostridium*.

Die beiden anaeroben Spezies *Acidaminococcus fermentans* und *Clostridium symbiosum* unterscheiden sich in ihrem phänotypischen Erscheinungsbild grundlegend voneinander. Während es sich bei *Acidaminococcus fermentans* um einen nicht-mobilen, gram-negativen Diplococcus handelt, bildet *Clostridium symbiosum* Gram-positive und polar begeißelte, zitronenförmige Zellen aus.

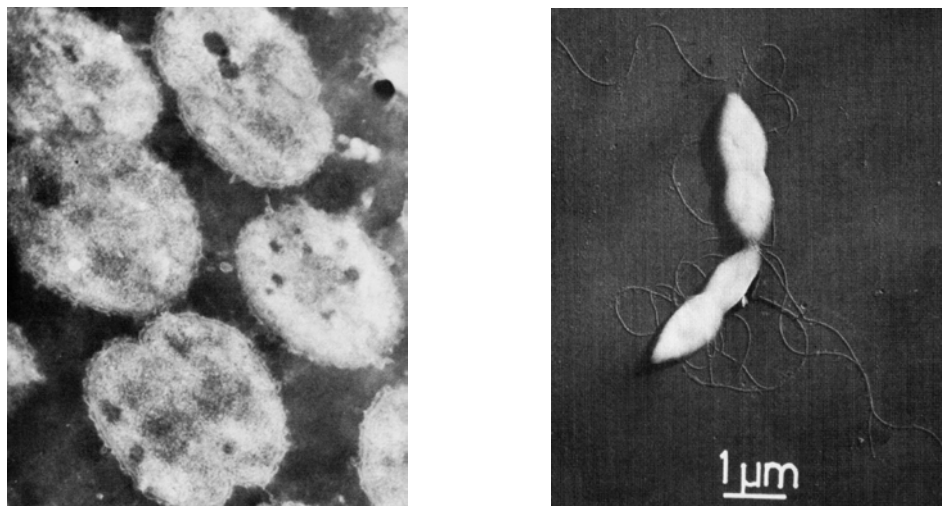


Abb. 1: *Acidaminococcus fermentans* (Rogosa, 1969) und *Clostridium symbiosum* (Buckel, 1983) im Vergleich

Acidaminococcus fermentans wurde aus Schweinekot isoliert und 1969 erstmals eingehend beschrieben (Rogosa, 1969). Die 16S rRNA-Analyse ergab eine Verwandtschaft zu den Clostridien, deren Gram-negative Vertreter den Cluster IX (Sporumusa) zugeordnet wurden. Später wurde das Cluster IX in die Familie *Acidaminococcaceae* umbenannt, da die 16S rRNA von *Acidaminococcus fermentans* als erste dieser Gruppe sequenziert worden war.

Clostridium symbiosum wird in der Einteilung nach Collins dem Cluster XIVa zugewiesen. Erstmals wurde dieses Bakterium in Kulturen des Einzellers *Entamoeba histolytica* nachgewiesen (Kaneuchi et al., 1973). Aus dieser symbiontischen Lebensgemeinschaft stammt auch der Name des Organismus. Mittlerweile kann man *Clostridium symbiosum* aus dem Darmtrakt des Menschen und weiterer Säuger isolieren (Skerman et al., 1980).

Abbildung 2 zeigt die phylogenetische Verwandtschaft der in dieser Arbeit verwendeten Bakterien sowie deren Einordnung unter den übrigen in der AG Buckel verwendeten *Clostridia*.

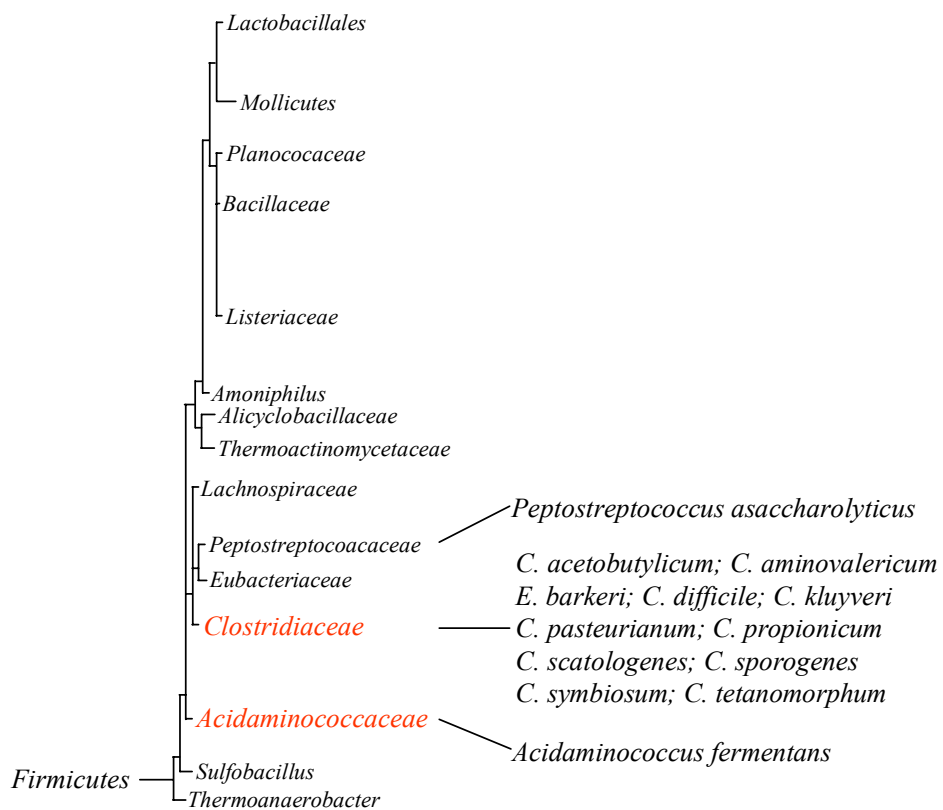
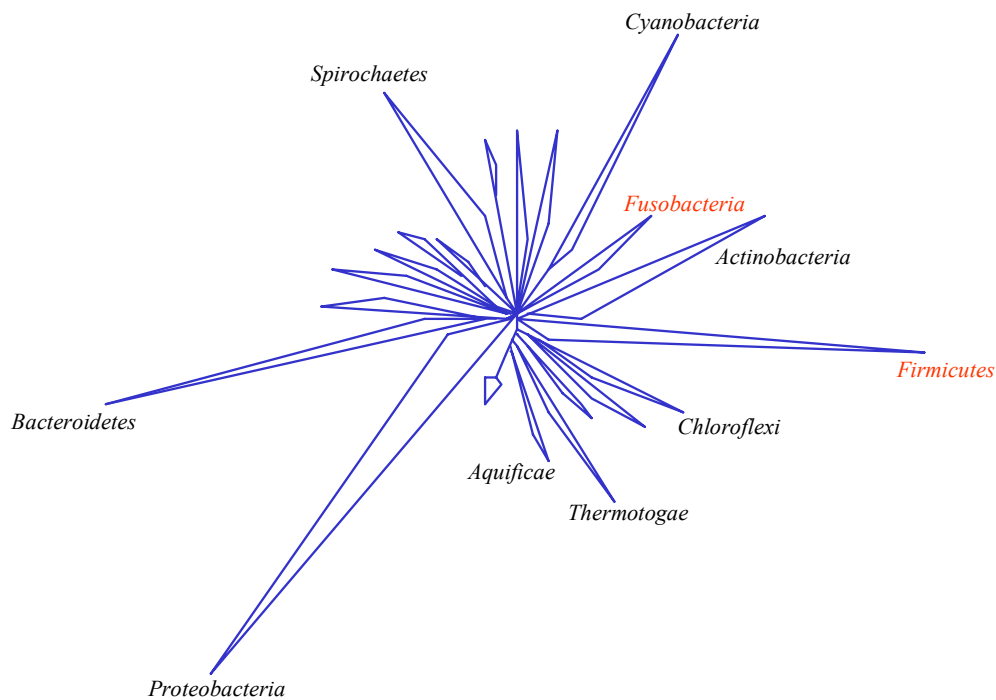
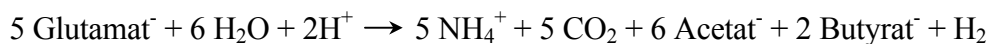


Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum der sowohl in dieser Arbeit als auch im Labor der AG Buckel verwendeten *Clostridia* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 1).

2 Anaerober Glutamatabbau

Viele Vertreter der Ordnungen *Clostridiales* und *Fusobacteriales* besitzen die einzigartige Fähigkeit, Aminosäuren zur Energiekonservierung zu fermentieren. Dabei wird jede der 20 proteinogenen Aminosäuren über mindestens einen Weg zu Ammonium, Kohlendioxid, Fettsäuren und molekularem Wasserstoff abgebaut.

Der am besten charakterisierte Stoffwechselweg ist der anaerobe Abbau von Glutamat. In diesem Fall sind bisher mindestens vier verschiedene Fermentationswege bekannt. Die zwei verschiedenen Abbauewege über das jeweilige Zwischenprodukt 3-Methylaspartat bzw. 2-Hydroxyglutarat stellen die beiden wichtigsten Glutamatfermentation dar und führen jeweils zu identischen Endprodukten (Buckel & Barker, 1974):



$\Delta G^\circ = -59 \text{ kJ/mol Glutamat}$ (98 kJ/mol ATP), (0,6 ATP/Glutamat)

Im 3-Methylaspartatweg (Fig. 3) wird die lineare Kohlenstoffkette des Glutamats zum verzweigten Kohlenstoffskelett des (2*S*,3*S*)-3-Methylaspartats unter Mitwirkung der Coenzym B₁₂-abhängigen Glutamat-Mutase umgewandelt (Barker et al., 1964; Reitzer et al., 1998; Gruber & Kratky, 2002). Die nachfolgende Ammoniumabspaltung wird durch die ungewöhnliche Mutase-Reaktion dadurch erleichtert, da das β -H-Atom im Methylaspartat in aktivierter Form vorliegt. Der weitere Abbau erfolgt über Mesaconat, welches zu (*S*)-Citramalat hydratisiert wird. Letzteres wird mittels einer Lyase zu Acetat und Pyruvat gespalten (Buckel & Bobi, 1976). Pyruvat wird abschließend zu CO₂, Butyrat und H₂ disproportioniert. Dieser Abbaueweg wird von im Boden lebenden *Clostridien* und verwandten Bakterien beschritten, unter anderem *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium cochlearium*, *Clostridium lentoputrescens*, *Clostridium limosum*, *Clostridium melanominatum* und *Clostridium tetanii*.

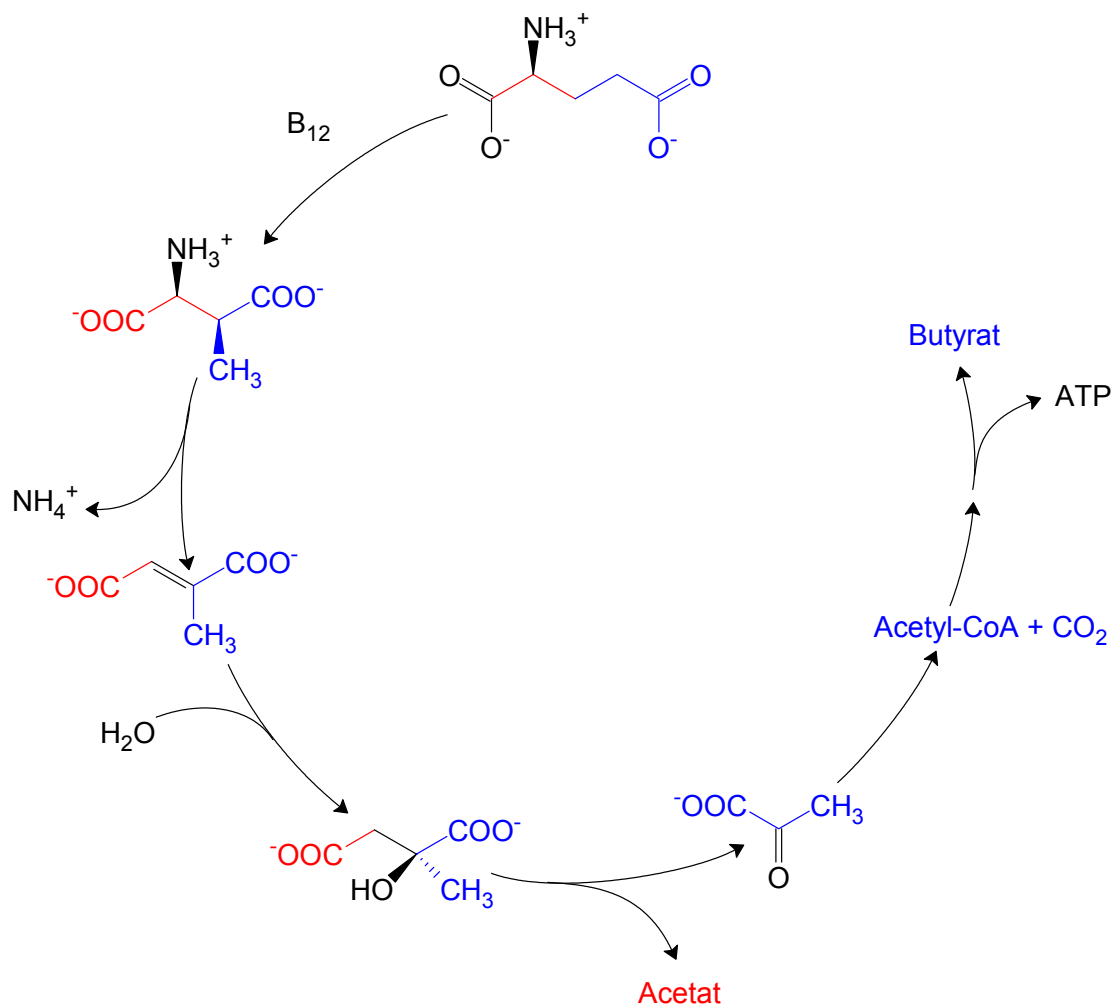


Abb. 3: Fermentation von Glutamat über den Coenzym-B₁₂-abhängigen Methylaspartat-Weg

Die Fermentation von Glutamat über das Zwischenprodukt 2-Hydroxyglutarat (Fig. 4), dem danach benannten Hydroxyglutarat-Weg, endet bei denselben Produkten – Ammonium, CO₂, H₂, Acetat und Butyrat – wie im eben beschriebenen Methylaspartat-Weg. Der Abbau des Glutamats wird durch oxidative Desaminierung und anschließende Reduktion der 2-Ketogruppe initiiert. Nach der Überführung in den entsprechenden 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Ester erfolgt eine reversible *syn*-Eliminierung von Wasser zum anschließenden (*E*)-Glutaconyl-CoA (Schweiger et al., 1987; Horler et al., 1966). Die Wasserabspaltung wird von dem Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges, der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase katalysiert (Schweiger et al., 1987). Durch die nachfolgende Decarboxylierung des Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA wird ein elektrochemischer Natriumgradient aufgebaut (Buckel, 1986).

Disproportionierung des Crotonyl-CoA führt zu Acetat, Butyrat, molekularem Wasserstoff und der Bildung von ATP mittels Substratkettenphosphorylierung.

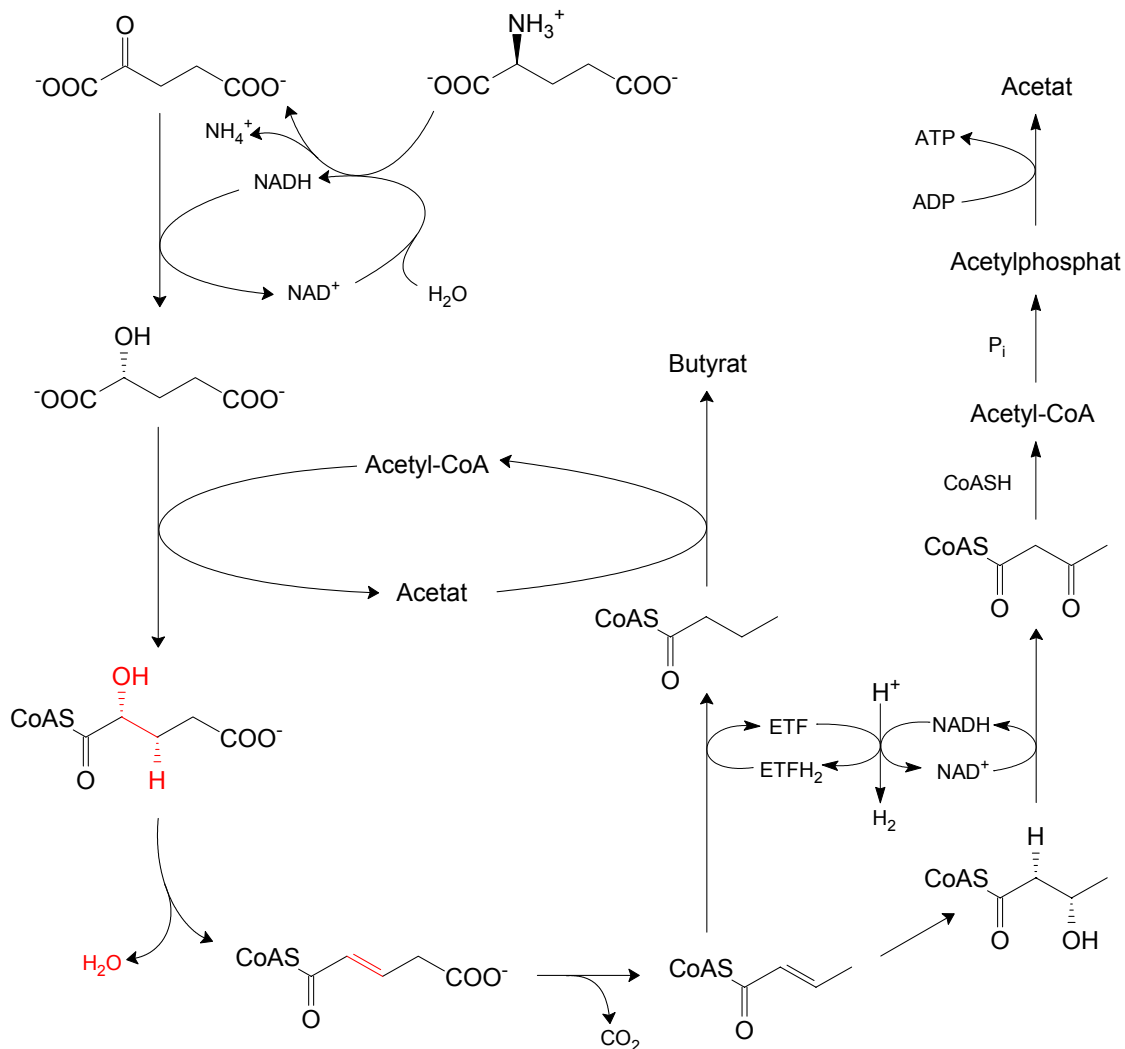
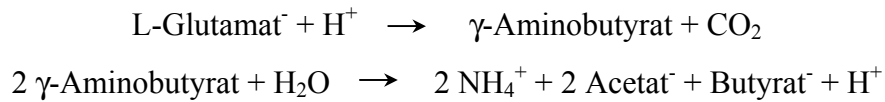


Abb. 4: Fermentation von Glutamat über den 2-Hydroxyglutarat-Weg

Dieser Abbauweg wurde bisher ausschließlich in *Clostridien* oder verwandten Bakterien gefunden, welche in anaeroben Nischen von Säugern (u.a. der Mensch) oder Vögeln leben. Darunter finden sich z.B. *Fusobacterium nucleatum* (Fusobacteriaceae), *Acidaminococcus fermentans* (Acidaminococcaceae) und *Clostridium symbiosum*.

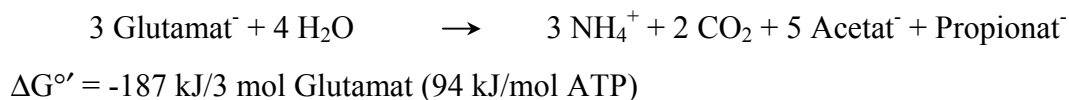
Ein dritter bekannter Fermentationsweg von Glutamat stellt der sog. 4-Aminobutyrat-Weg dar, welcher das namensgebende γ -Aminobutyrat als Zwischenprodukt beinhaltet. Für diesen Abbauweg werden zwei verschiedene

Organismen benötigt, ein Organismus (z.B. *Escherichia coli*) muss zur Decarboxylierung von Glutamat fähig sein, während ein weiterer (z.B. *Clostridium aminobutyricum*) das entstandene γ -Aminobutyrat zu Acetat und Butyrat fermentiert.



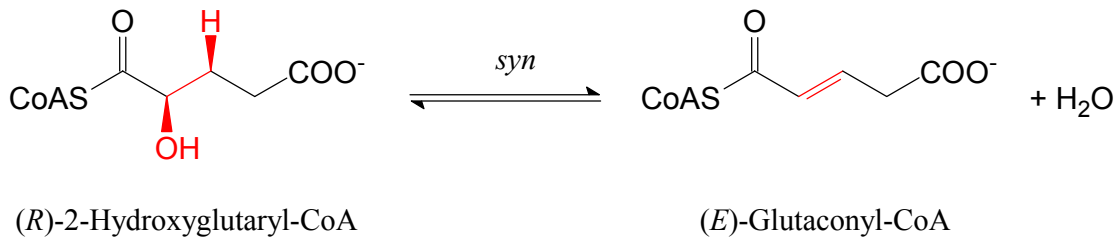
γ -Aminobutyrat dient in tierischen Organismen als Neurotransmitter und wird daher in vielen Eukaryoten gebildet. Bakterien bilden diesen Stoff ebenfalls um H^+ zu verbrauchen; im Gegensatz zu Eukaryoten wird in diesem Fall γ -Aminobutyrat ausgeschieden. *Clostridium aminobutyricum* ist der zur Zeit einzige bekannte Organismus, welcher γ -Aminobutyrat fermentieren kann. Das Substrat wird hierbei zu Succinatsemialdehyd transaminiert und anschließend mittels NADH reduziert. Diese Reaktion führt zu 4-Hydroxybutyrat. Der weitere Abbau führt über 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA (Scherf & Buckel, 1993) und ist der Succinat-Ethanol-Fermentation aus *Clostridium kluyveri* sehr ähnlich (Scherf et al., 1994; Willadsen & Buckel, 1990).

Ein vierter bekannter Fermentationsweg von Glutamat führt zur Bildung von CO_2 , H_2 und Propionat und ist in *Selenomonas acidaminophila* und *Barkera propionica* (Cluster IX) anzutreffen. Vermutlich handelt es sich bei diesem Weg um eine Kombination aus dem geschilderten Methylaspartat-Weg (Abbau von Glutamat zu Acetat und Pyruvat) und einer Disproportionierung von Pyruvat zu Propionat und Acetat. In diesem Beispiel sind dementsprechend zwei Coenzym B_{12} -abhängige Enzyme beteiligt, die schon erwähnte Glutamat-Mutase und die Methylmalonyl-CoA-Mutase, welche Succinyl-CoA zu (R)-Methylmalonyl-CoA umwandelt. In diesem Stoffwechselweg werden 2 mol ATP aus 3 mol Glutamat konserviert.



3 (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Das Schlüsselenzym des 2-Hydroxyglutarat-Weges stellt die (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase dar. Es katalysiert die reversible *syn*-Eliminierung von Wasser aus (*R*)-2-Hydroxyglutarat zu (*E*)-Glutaconyl-CoA.



Die katalytische Wasserabspaltung macht es notwendig, dass ein am C-3 Atom befindliches Proton abgespalten werden muss, dessen $\text{p}K_s$ -Wert über 40 liegt (Buckel, 1996). Aus diesem Grund ist diese chemische Reaktion als schwierig anzusehen. Weiterhin würde im Falle einer E2-ähnlichen Eliminierung eine positive Partialladung am C-2 Atom entstehen. Diese Ladung würde sich daraufhin in unmittelbarer Nachbarschaft zum ebenfalls partiell positiv geladenen Carbonylkohlenstoff befinden. Eine solche Nachbarschaft zweier positiver Ladungen ist ebenfalls als energetisch ungünstig zu betrachten.

Bei der Rückreaktion würde man eine Addition von Wasser an C-3 des Glutaconyl-CoA erwarten. Tatsächlich beobachtet man ausschließlich die Bildung des an C-2 substituierten Produktes.

Um dieses Problem der auftretenden positiven Partialladungen in unmittelbarer Nachbarschaft zumindest theoretisch zu lösen, wurde ein Mechanismus für die von 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen katalysierte Wasserabspaltung postuliert (Buckel, 1996). Dabei verläuft die Reaktion über radikalische Zwischenstufen, sogenannte Ketyl-Radikalanionen. Hier wird durch eine Umpolungsreaktion das Auftreten der positiven Partialladungen umgangen, wobei die Azidität des C-3-Protons deutlich erhöht wird.

Dieser Ketylmechanismus wird im Anschluss ausführlich vorgestellt.

Die (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wurde bislang aus drei verschiedenen Organismen, welche Glutamat fermentieren, isoliert; aus *Acidaminococcus fermentans*, *Clostridium symbiosum* und *Fusobacterium nucleatum* (Schweiger et al, 1987; Klees et al., 1992; Müller & Buckel, 1995; Dutscho et al., 1989). Dabei konnte gezeigt werden, dass aktive (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Acidaminococcus fermentans* und *Clostridium symbiosum* aus einem Zweiprotein-System besteht, den Komponenten A und D. Komponente D, die eigentliche Dehydratase, sprich das aktive katalytische Enzym, liegt in beiden Organismen in heterodimerer Struktur vor mit einer ähnlichen molekularen Masse ($\alpha\beta$, 96 kDa). Komponente A, das aktivierende Enzym, konnte als Homodimer (γ_2 , 54 kDa) identifiziert und kristallisiert werden (Locher et al., 2001).

Bei beiden Enzymen konnte mittels HPLC und UV-vis-Spektroskopie gezeigt werden, dass sie zu der Gruppe der Eisen-Schwefel-Flavoproteine gehören. Aus der Komponente D von *Acidaminococcus fermentans* konnten 4 Nicht-Häm-Eisen und 3 säurelabile Schwefel und aus *Clostridium symbiosum* 8 Nicht-Häm-Eisen und 7 säurelabile Schwefel bestimmt werden. Dies deutet auf das Vorhandensein eines bzw. zweier $[4\text{Fe-4S}]$ Cluster hin. In der Vergangenheit konnte allerdings mittels EPR-Spektroskopie kein Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den Clustern tatsächlich um Cubane handelt. Dies liegt daran, dass der erwartete Redoxzustand ($[4\text{Fe-4S}]^{2+}$) diamagnetisch und somit EPR-inaktiv ist. Sämtliche Versuche zur Reduktion dieser Cluster schlugen fehl. Versuche mittels Mössbauerspektroskopie konnten belegen, dass in Komponente D diamagnetische $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster vorliegen. Weiterhin konnte in der Dehydratase aus beiden Organismen 1 mol FMN/mol Enzym bestimmt werden. Ebenfalls detektiert wurden substöchiometrische Mengen an Riboflavin. Ob Riboflavin eine physiologische Bedeutung besitzt oder nur unspezifisch an das Enzym gebunden ist, ist zur Zeit noch nicht geklärt.

Die Komponente A aus *Acidaminococcus fermentans* konnte im Jahr 2000 kristallisiert und die dreidimensionale Struktur gelöst werden (Locher et al., 2001). Hierbei zeigte sich, dass es sich bei dem Enzym um ein Homodimer handelt, wobei ein $[4\text{Fe-4S}]$ Cluster beide Untereinheiten verbrückt. Diese Struktur, das sogenannte Helix-Cluster-Helix Motiv, findet sich ebenfalls im Fe-Protein (Komponente II) der Nitrogenase wieder. Des weiteren ist in jeder Untereinheit eine ATP-Bindestelle lokalisiert, die in der Struktur mit ADP besetzt sind. Diesbezüglich weist Komponente A eine hohe Ähnlichkeit zu den Faltungstypen der Zucker-Kinasen, des Aktins sowie

des Hsp70-Proteins auf (Bork et al., 1992). ATP-Bindung führt bei diesen Enzymen zu starken Konformationsänderungen. Anhand der biochemischen und spektroskopischen Aspekte beider Systeme, kann man zwar nicht von einer strukturellen, aber von einer funktionellen Ähnlichkeit des Dehydratasesystems und der Nitrogenase sprechen.

Im Gegensatz zu Komponente D aus den beiden oben genannten Organismen besteht die 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Fusobacterium nucleatum* aus einem heterotrimeren Protein ($\alpha\beta\gamma$, 42 + 34 + 24 kDa). Es konnte jüngst gezeigt werden, dass auch das Dehydratasesystem aus *Fusobacterium* eine Komponente A benötigt (Tamannaei & Buckel, unveröffentlichte Ergebnisse). Weiterhin konnten durch chemische Bestimmungen jeweils 3-4 Nicht-Häm-Eisen und säurelabile Schwefel detektiert und somit ein [4Fe-4S]Cluster postuliert werden. Flavinbestimmungen ergaben kein FMN, anders als bei den anderen Dehydratasen. Allerdings konnten signifikante Mengen an Riboflavin gefunden werden, mit 0,5-0,6 mol/mol Enzym. Ob das fusobakterielle System tatsächlich nur Riboflavin als Kofaktor enthält, ist nicht sicher belegt.

Zur *in vitro*-Aktivierung des Dehydratasesystems aus *A. fermentans* und *C. symbiosum* sind neben den Komponenten D und A weiterhin ATP, Mg^{2+} und ein starkes Reduktionsmittel, wie Ti(III)citrat, notwendig. In vorangegangenen Untersuchungen des Dehydratasesystems (Hans et al., 2002) konnte ein Flavodoxin gereinigt werden, welches *in vivo* die Rolle des Reduktionsmittels übernehmen kann. Es ist davon auszugehen, dass ebenso Ferredoxin in reduzierter Form als natürlicher Elektronendonator fungiert (Thamer et al., 2003).

In *Acidaminococcus fermentans* existiert ein sogenanntes Hydroxyglutarat-Operon, in dem nicht nur die Gene der drei am Dehydratasesystem beteiligten Regionen (*hgdC*, *hgdA*, *hgdB*) organisiert sind, sondern auch die Gene der Glutaconat-CoA-Transferase (*gctA*, *gctB*), sowie das Gen für die α -Untereinheit der membranständigen Glutaconyl-CoA Decarboxylase (*gcdA*). Mittlerweile sind aus weiteren Organismen ähnliche Genorganisationen bekannt (Abb. 5).

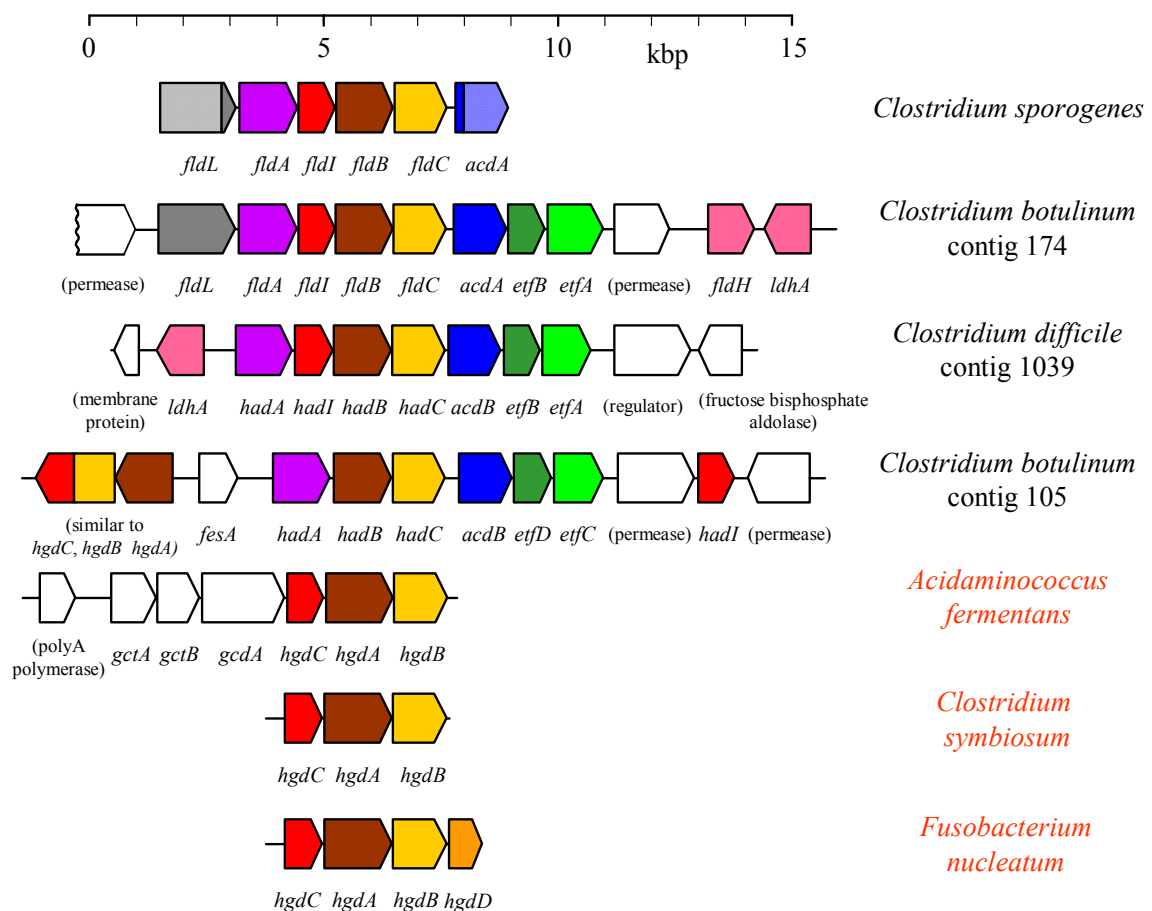


Abb. 5: Lokalisation der an verschiedenen Dehydratasesystemen beteiligten Gene

4 Bekannte Kofaktoren der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase und deren mögliche Rolle

Jahrzehntelang galt es als ziemlich sicher, das Leben hätte in einer Art Ursuppe begonnen, wie es Stanley Miller 1953 in seinem legendären Versuch aufzeigen wollte (Lazcano & Bada, 2003). Diese Theorie gilt heutzutage als überholt. Die chemische Zusammensetzung der Ur-Atmosphäre und das reichliche Vorhandensein von Eisen und Schwefel veranlasste Günter Wächtershäuser 1988, eine Hypothese aufzustellen, welche die Ursprünge des Lebens als chemoautotrophen Prozess versteht (Wächtershäuser, 1988; Wächtershäuser, 1992). Dabei wird angenommen, dass dieser Prozess in einer heißen, anoxischen Umgebung (Black Smoker) stattgefunden hat. Die Reaktion von

Eisensulfid mit H_2S -Gas bzw. in Wasser gelöstem Sulfid führt zur Bildung von Pyrit. Dieses – an der Oberfläche positiv geladene Metall – dient als Katalysator für vielfältige Reaktionen. Heutzutage gibt es eine Vielzahl von Beispielen für Proteine, welche Eisen-Schwefel-Zentren, sogenannte Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppen aufweisen (Cammack & Sykes, 1999).

In der Metalloproteinforschung stellte die Entdeckung von Eisen-Schwefel-Clustern als prosthetische Gruppen von Proteinen eine bahnbrechende Entwicklung dar (Beinert & Palmer, 1965; Beinert, 1976; Beinert & Thomson, 1983; Beinert, 1990; Beinert et al., 1997; Beinert, 2000). Die Bestimmung von säurelabilem Schwefel und EPR-aktiven Spezies (wegweisend in dieser Technik war Helmut Beinert) in Nicht-Häm-Eisen-Proteinen bewies zum ersten Mal die Anwesenheit von Eisen-Schwefel-Clustern in diesen Enzymen (Beinert, 1985).

Mit Hilfe der EPR-Spektroskopie (Electron Paramagnetic Resonance) ist es möglich, ungepaarte Elektronen von Elementen (z.B. Eisen) zu detektieren. Übergangsmetallionen und ihre Komplexe weisen mehrere ungepaarte Elektronen auf, deren sog. Spins bei starkem elektrischen Feld maximal gepaart (Low-Spin Zustand) oder bei schwachem äusseren Feld maximal ungepaart (High-Spin Zustand) sind. Bei Wechselwirkungen dieser Elektronen von Metallzentren mit einzelnen Elektronen in d-Orbitalen sind unterschiedliche g-Faktoren zu beobachten. Diese Werte der g-Faktoren können als Identifikationsmerkmal verwendet werden. So kann das EPR-Spektrum eines paramagnetischen Metallkomplexes Informationen zum Elektronenspin des betreffenden Metalls liefern; für Eisen-Schwefel Proteine sind meist rhombische oder axiale EPR-Signale bekannt. Das Auftreten dieser g-Faktoren sowie zusätzliche Aufspaltung in sogenannte Super-Hyperfeinstrukturen lässt eine intensivere Charakterisierung des Metallkomplexes im Protein zu.

Im Verlauf der Jahre stellen die Eisen-Schwefel-Proteine die größte und komplexeste Gruppe der Metalloproteine dar (s.o. Beinert etc). Die immer schnellere Verfügbarkeit von dreidimensionalen Strukturen, aber auch die Darstellung von Modellkomplexen und deren Untersuchungen, erlauben eine detailliertere Identifikation und Diskussion über Struktur und Funktion der unterschiedlichen Eisen-Schwefel-Cluster. Derzeit sind vier verschiedene Clustertypen bekannt: Rubredoxin-artige, $[\text{2Fe-2S}]$, $[\text{3Fe-4S}]$ und $[\text{4Fe-4S}]$ Cluster (Abb. 6).

Protein	Cluster	Oxidations- Zustand	formale Wertigkeit	EPR <i>g</i> -Werte	λ_{\max} [nm] ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} / \text{Fe}$)
Rubredoxin	Fe^{3+}	oxidiert	Fe^{3+}	4,3; 9	390 (10,8)/490 (8,8)
	Fe^{2+}	reduziert	Fe^{2+}	–	310 (10,8)/335 (6,3)
2Fe- Ferredoxin	$[\text{2Fe-2S}]^{2+}$	oxidiert	2Fe^{3+}	–	325 (6,4)/420 (4,8)/ 465 (4,9)
	$[\text{2Fe-2S}]^{1+}$	reduziert	1Fe^{3+} 1Fe^{2+}	1,89; 1,95; 2,05	
3Fe- Ferredoxin	$[\text{3Fe-4S}]^{+}$	oxidiert	3Fe^{3+}	1,97; 2,00; 2,02	305 (7,7)/415 (5,2)/455 (4,4)
	$[\text{3Fe-4S}]^0$	reduziert	2Fe^{3+} 1Fe^{2+}	–	425 (3,2)
4Fe- Ferredoxin	$[\text{4Fe-4S}]^{3+}$	oxidiert	3Fe^{3+} 1Fe^{2+}	2,04; 2,04; 2,12	325 (8,1)/385 (5,0)/450 (4,6)
	$[\text{4Fe-4S}]^{2+}$	Haupt- form	2Fe^{3+} 2Fe^{2+}	–	305 (4,9)/390 (3,8)
	$[\text{4Fe-4S}]^{1+}$	reduziert	1Fe^{3+} 3Fe^{2+}	1,88; 1,92; 2,06	uncharakter- istisch

Abb. 6: Die bekannten Arten der Eisen-Schwefel-Cluster (aus W. Kaim, B. Schwederski: *Bioanorganische Chemie*. Teubner, 1991)

Zum einfachsten 'Clustertyp' zählt das sogenannte Rubredoxin. Diese Struktur enthält keinen säurelabilen Schwefel und das Fe-Atom ist über vier Cysteine im Protein koordiniert. Bei der ω -Hydroxylierung von Fettsäuren in *Pseudomonas oleovorans* konnte die Funktion des Rubredoxins als Elektronenüberträger gezeigt werden (Lode & Coon, 1971). Daher wird diese Struktur auch zu den Eisen-Schwefel-Clustern gezählt, obwohl sie kein richtiges Cluster enthält.

Als klassische Eisen-Schwefel-Proteine sind die sogenannten Ferredoxine bekannt geworden. Chloroplasten- bzw. Pflanzen-Ferredoxine sind typische Vertreter der wohl am häufigsten anzutreffenden Funktion, die Ein-Elektronen-Transfer-Reaktion. Ihre [2Fe-2S]-Zentren werden über vier Cysteine im Protein koordiniert (Otake & Ooi, 1989; Rypniewski et al., 1991). Eine besondere Gruppe von [2Fe-2S]-Proteinen stellen modifizierte Eisen-Schwefel-Cluster dar. In diesem Fall werden zwei der vier das Zentrum koordinierende Cysteine durch Histidinliganden ersetzt. Diese Rieske-Zentren sind in der Regel als funktionelle Untereinheiten der *bc₁/b₆f*-Cytochrome bekannt (Soriano et al., 1999; Berry et al., 2000; Iwata et al., 1996). Beispiele für etwas unterschiedlichere Rieske-Zentren sind die Vertreter von *Sulfolobus acidocaldarius* und *Thermus thermophilus* (Henninger et al., 1999; Kuila & Fee, 1986), sowie bakterielle Dioxygenasen, deren Redoxpotentiale sich von den genannten Rieske-Proteinen und Pflanzen-Typ-Ferredoxinen unterscheidet (Mason & Cammack, 1992; Link et al., 1996).

Proteine mit [4Fe-4S]Cluster bilden die größte Gruppe der bekannten Eisen-Schwefel-Proteine. Dieser Cuban-Cluster wird von vier Cysteinen koordiniert. Die [4Fe-4S]-elektronentransferierenden Proteine werden in „lowpotential“ (bakterienartige) und „highpotential“ (HiPIP) Ferredoxine unterteilt. Mittels kombinierter EPR- und Mössbauer-spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Eisen-Schwefel-Cluster in verschiedenen Oxidationsstufen bzw. -zuständen vorliegen. Das heißt, dass die Elektronen häufig delokalisiert sind und daher nur ein Mittelwert der einzelnen Eisen-Oxidationszustände darstellen (Huynh & Kent 1984). Die [4Fe-4S]Cluster können in vier verschiedenen Redoxzuständen vorliegen, wobei der am häufigsten anzutreffende Zustand der diamagnetische $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Zustand ist, $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ stellt den oxidierten, $[4\text{Fe-4S}]^{+}$ den reduzierten Zustand dar. Im Fall der „lowpotential“ Ferredoxine ist der formale Redoxzustand der Eisens $[2\text{Fe}^{3+}, 2\text{Fe}^{2+}]$ oder $[1\text{Fe}^{3+}, 3\text{Fe}^{2+}]$, im Fall der „highpotential“ Ferredoxine $[3\text{Fe}^{3+}, 1\text{Fe}^{2+}]$ oder $[2\text{Fe}^{3+}, 2\text{Fe}^{2+}]$. Der vierte Redoxzustand, die sogenannte „all ferrous“ Form ($[4\text{Fe-4S}]^0$), kann durch Überreduktion der Nitrogenase-Reduktase und der Komponente A der 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen hergestellt werden.

Häufig sind Enzyme mit [3Fe-4S]Clustern anzutreffen, wobei es sich je nach Enzym um eine aktive prosthetische Gruppe oder um eine inaktivierte Form handelt. Die inaktive Form der Aconitase enthält einen [3Fe-4S]Cluster, der durch Zugabe von

Fe^{2+} und Reduktionsmittel in die aktive Form überführt werden kann (Rouault & Klausner, 1996). Eine weitere bekannte Funktion von $[\text{4Fe-4S}]$ Clustern ist deren Beteiligung als Koordinator für Substrate (Lewis-Säure). Bekannte Vertreter dieser Funktionsgruppe sind z.B. die Aconitase des Citratzyklus (Beinert & Kennedy, 1993), die Fumarase aus *E. coli* oder die L-Serin-Dehydratase aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Hofmeister et al., 1994). Eine Gemeinsamkeit dieser Eisen-Schwefel-Clustern ist, dass nur drei der vier Eisen über Cystein koordiniert werden, während am vierten Eisen-Atom eine Wechselwirkung zu einer Hydroxylgruppe besteht. Hierbei vermag das „labile Eisen“ die zu abstrahierende OH-Gruppe so zu koordinieren, um dann als Lewis-Säure in die Katalyse einzugreifen. Oxidation des in den oben genannten Beispielen vorhandenen Cluster führt zum Verlust des labilen Eisens, somit zur Bildung eines $[\text{3Fe-4S}]$ -Zentrums und damit verbundenem Aktivitätsverlust (Kennedy et al., 1983; Emptage et al., 1983). Ebenfalls erwähnenswert sind hierbei kleine High-Potential-Iron-Sulfur-Proteine (6-10 kDa), deren relativ hohes Redoxpotential von 0 bis +500 mV (Dus et al., 1967) Elektronenübertragungsprozesse in der Photosynthese (Evans & Crofts, 1974) bzw. in anaeroben Stoffwechselwegen bei Bakterien ermöglicht (Bartsch, 1978). Ein Beispiel von elektronenübertragenden Eisen-Schwefelproteinen stellen die an der Atmungskette beteiligten Komplexe I und II dar.

Eine weitere interessante Funktion der Eisen-Schwefel-Cluster stellt den Einsatz als regulatorisches Zentrum dar. Das bekannteste Beispiel hierfür ist der Sauerstoff-Sensor FNR aus *E. coli* (Khorodhilova et al., 1997; Popescu et al., 1998). Im Falle von fakultativ anaerober Organismen steuert dieser Transkriptionsfaktor die Expression der für den anaeroben Stoffwechsel benötigten Gene. FNR besitzt in der aktiven Form (FNR-Dimer ist an die DNA gebunden) einen $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ Cluster, der von molekularem Sauerstoff in einen $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ Cluster umgewandelt und inaktiviert wird. Interessanterweise wird diese inaktivierte Form *in vivo* – unter erneuten anaeroben Bedingungen – wieder in eine aktive, $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ Cluster enthaltende Form, umgewandelt (Popescu et al., 1998).

Eisen-Schwefel-Zentren werden auch für strukturelle Funktionen diskutiert, wobei die Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase aus *Bacillus subtilis* (Switzer, 1989; Onate et al., 1989) das beste untersuchte Beispiel darstellt. Hier – wie auch bei der DNA-Endonuklease III (Cunningham et al., 1989; Kuo et al., 1992) –

ist der [4Fe-4S]Cluster essentiell für die Ausbildung eines aktiven Enzyms, wobei keinerlei katalytische Funktion detektiert wurde.

Ungleich komplexere Eisen-Schwefel-Zentren wurden in der Nitrogenase gefunden (Grossman et al., 1999; Smith & Eady, 1992; Rees & Howard, 1999). Dieses Enzym katalysiert die ungewöhnliche Reduktion von molekularem Stickstoff zu Ammoniak (Rees & Howard, 1999). Der sogenannte P-Cluster setzt sich aus zwei [4Fe-4S]Cluster zusammen, welche miteinander über zwei Cysteine verbrückt sind und eine Disulfidbindung zwischen zwei anorganischen Sulfiden der Fe-S-Zentren aufbauen. Der FeMo-Kofaktor (FeMoCo) aus Nitrogenase stellt eine Kombination aus einem [4Fe-3S]- und einem [1Mo-3Fe-3S]Cluster dar. Diese beiden Zentren sind über drei Schwefel-Liganden verbrückt (Link et al., 1996), wobei der MoCo das aktive Zentrum bildet.

Eine letzte Darstellung soll kurz auf die möglichen Kombinationen von Eisen-Schwefel-Zentren mit anderen Metall-Kofaktoren verweisen. Ein Beispiel stellt die Nickel-Eisen Hydrogenase dar, welche in einer Redoxreaktion molekularen Wasserstoff aus Elektronen und Protonen bildet (Cammack, 1999). Durch Klärung der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass drei Eisen-Schwefel-Cluster in relativ kurzen Abständen zueinander angeordnet sind und somit einen intramolekularen Elektronentransport von der Peripherie zum aktiven Zentrum ermöglichen, welches aus einem Ni-Fe-Zentrum aufgebaut ist (Volbeda et al., 1995; Higuchi et al., 1997; Pierik et al., 1999).

Die (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase stellt nicht nur ein Eisen-Schwefel-Protein dar, es gehört zudem in die Klasse der sogenannten Flavoenzyme. Diese Klasse von Enzymen wurde 1932 durch die Entdeckung des „Old yellow enzyme“ begründet (Müller, 1983; Ghisla et al., 1989). Hauptsächlich kommen Riboflavin, Riboflavin-5'-phosphat (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) in Enzymen vor. Diese Flavine werden meist fest und selten kovalent an das Protein gebunden. Eine kovalente Bindung findet über C8- oder C6-Position des Isoalloxazin-Ringes, welches die reaktive Gruppe des Flavinmoleküls darstellt, statt (Müller, 1983) (Abb. 7).

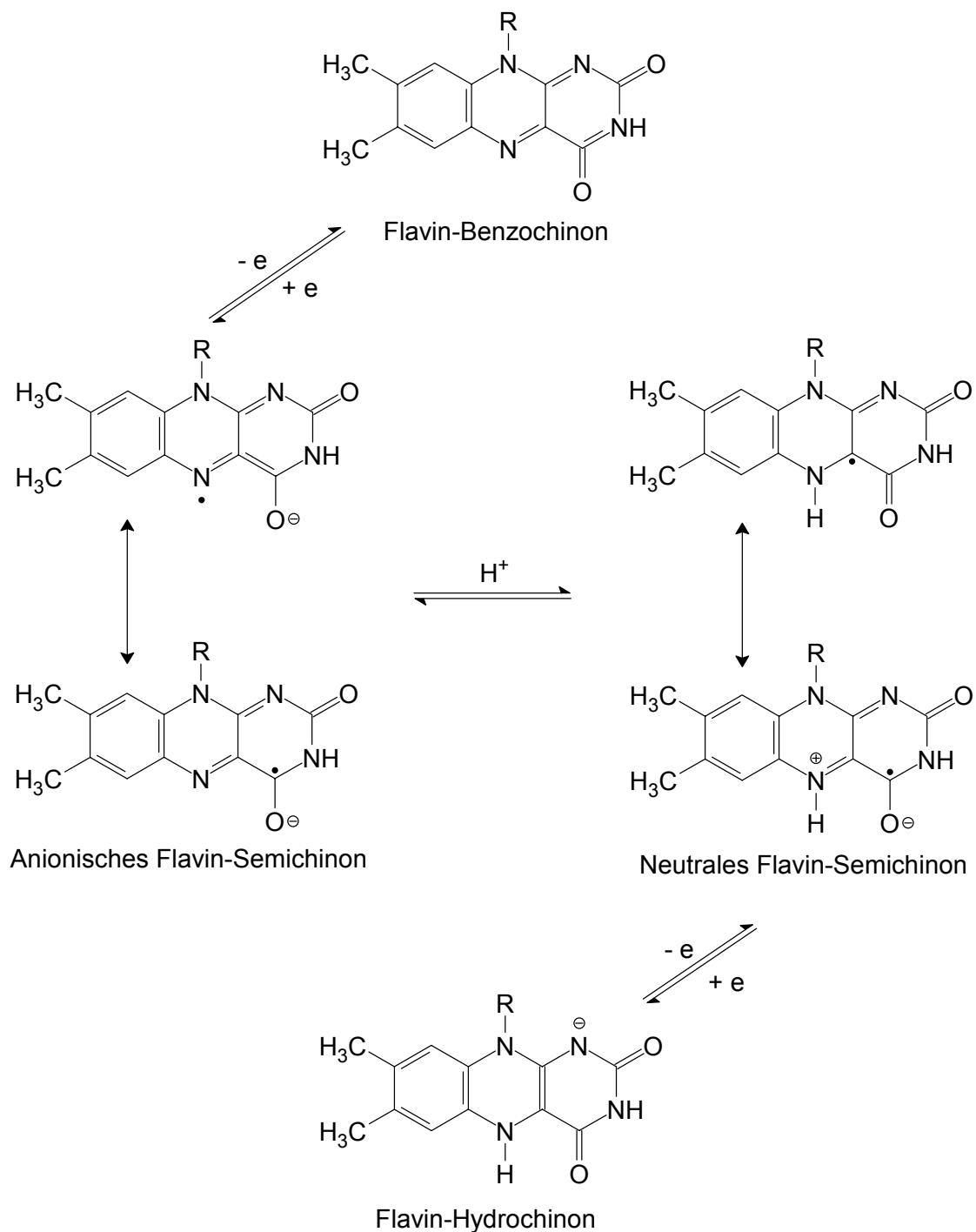


Abb. 7: Struktur biologischer Flavine

Je nach Flavoenzym wird ein Einelektronen- oder Zweielektronen-Transfer durchgeführt. Ein Einelektronen-Transfer und die damit verbundene Stabilisierung des intermediären organischen Radikals ist nur für wenige Flavoenzyme bekannt (Edmondson & Tollin, 1983). Ein Beispiel hierfür sind die Flavodoxine, kleine, dem

Ferredoxin ähnliche Proteine (Simonsen & Tollin, 1980). Für freies Flavin ist nur ein Zweielektronen-Transfer möglich. An den weit auseinander liegenden Redoxpotentialen kann man die Wirkung bzw. den Einfluss des Proteins auf die Reaktivität des Flavins diskutieren. Dies hat eine breite Variationsmöglichkeit zur Folge, so dass Flavoproteine nicht nur typische Redoxreaktionen katalysieren (Hydroxylasen, Oxygenasen), sondern auch bei lichtabhängigen Reaktionen wie DNA-Reparatur (DNA-Photolyase) (Park et al., 1995; Carell et al., 2001; Meighen, 1993) oder zur Lichtentwicklung in der Luciferase beteiligt sind.

5 Mechanismus der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Das Enzym 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase stellt das Schlüsselenzym des oben beschriebenen Hydroxyglutarat-Weges dar. Es katalysiert die *syn*-Eliminierung von Wasser aus (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA zu (*E*)-Glutaconyl-CoA. Diese bereits beschriebene Wasserabspaltung stellt eine chemisch schwierige Reaktion dar, und konnte in einem radikalischen Katalysemechanismus erklärt werden (Buckel & Keese, 1995; Buckel, 1996). Dieser Mechanismus nutzt einzigartige Eigenschaften des beschriebenen Enzymsystems. Zum einen enthalten beide Komponenten Eisen-Schwefel-Cluster, zum anderen ist die Aktivität des Enzymsystems von ATP sowie Reduktionsäquivalenten abhängig. Weiter besitzt Komponente D FMN als prosthetische Gruppe. Diese Konstellation lässt eine Redoxreaktion nach folgendem Schema vermuten (Buckel, 1996) (Abb. 8).

Dabei wird die Thioestercarbonylgruppe des Substrates durch eine Einelektronen-Reduktion in ein Ketylradikalanion umgewandelt. Durch diese sogenannte Umpolung ist der Carbonylkohlenstoff partiell negativ geladen. Dadurch wird das Problem der benachbarten gleichen Partialladungen umgangen, die Hydroxylgruppe an C-2 kann leichter eliminiert werden. Im entstandenen Enoxyradikal ist das Proton an C-3 deutlich azider geworden ($pK = 14$) (Smith et al., 2003) und kann somit abstrahiert werden. Diese erhöhte Azidität wird durch Mesomerieeffekte hervorgerufen. Nach der OH-Eliminierung wird das resultierende Ketylradikalanion reoxidiert, wodurch das Produkt (*E*)-Glutaconyl-CoA entsteht. Ein grosser Vorteil

dieses Mechanismus liegt in der „Rückgewinnung“ des Reduktionsäquivalentes, d. h. nachdem das Enzym wieder reduziert vorliegt, können mehrere „Turnover“ stattfinden.

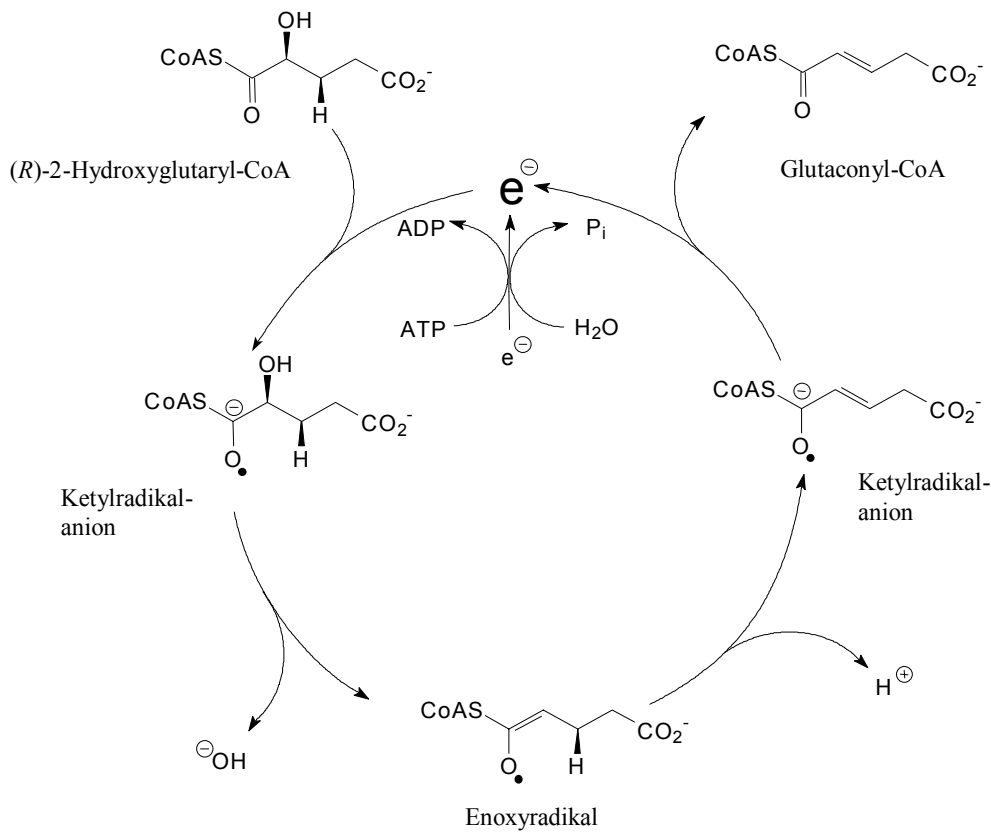


Abb. 8: Postulierter Ketylmechanismus der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Die Bereitstellung des energetisch aktivierten „Niedrig-Potential-Elektrons“ wird mittels ATP-Bindung und/oder Hydrolyse durch Komponente A, das aktivierende Enzym dieses Systems, katalysiert. Durch Komplexbildung mit Komponente D kann dieses Elektron zum aktiven Zentrum der eigentlichen Dehydratase gelangen und zur Reduktion des Substrates genutzt werden. Ein ähnliches System stellt das Nitrogenase-Fe-Protein dar. Die Nitrogenase katalysiert mit molekularem Wasserstoff die Reduktion von molekularem Stickstoff zu Ammoniak. Hierfür werden, vor allem aufgrund sehr hoher Aktivierungsenergien, 16 ATP benötigt. Wie schon unter Punkt 4 gezeigt wurde, sind an dieser Reaktion zwei Proteine beteiligt, das Fe-Protein und das MoFe-Protein (Grossman et al., 1997; Georgiadis et al., 1992; Kim et al., 1993; Schindelin et al., 1997). Ersteres überträgt unter ATP-Hydrolyse Elektronen auf die Metallcluster des

FeMo-Proteins und stellt somit ein funktionelles Äquivalent zur Komponente A des Dehydratasesystems dar. Der detaillierte Mechanismus der Nitrogenase-Reaktion ist bis heute ungeklärt; allerdings kann beobachtet werden, dass die Redoxäquivalente über reduziertes Flavodoxin zum Nitrogenase-Fe-Protein fließen. Von dort findet ein an ATP-Hydrolyse gekoppelter Elektronentransfer über den P-Cluster zum MoFe-Protein statt. Sowohl das Fe-Protein als auch Komponente A können als ATP-abhängige Redoxverstärker verstanden werden. Schon die alleinige Bindung von ATP setzt das Redoxpotential des [4Fe-4S]Clusters von -300 mV auf -430 mV herab (Lanzilotta et al., 1995/1996). Durch Lösung der Kristallstruktur von Komponente A konnte gezeigt werden, dass die homodimere Struktur durch einen [4Fe-4S]Cluster verbrückt ist (Locher et al., 2001). Biochemische Untersuchungen belegen des weiteren eine ähnliche Funktion von Komponente A und dem Fe-Protein der Nitrogenase.

Weiterhin wurden für andere Enzyme Mechanismen postuliert, in denen Ketylradikale als Zwischenstufen auftreten. Das ist zum einen die Benzoyl-CoA Reduktase aus *Thauera aromatica*, welche den Aromatenabbau über eine CoA-aktivierte Zwischenstufe katalysiert (Breese et al., 1998). Im Gegensatz zur 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase werden bei diesem Elektronenübertragungsprozess stöchiometrische Mengen an ATP hydrolysiert (Boll & Fuchs, 1995/1998; Boll et al., 1997).

Zum anderen wird der Ketylmechanismus für vergleichbare Reaktionen, an denen CoA-Ester als aktive Substrate vorliegen, diskutiert. Beispiele hierfür sind die Wassereliminierungen von Lactat durch die Lactyl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium propionicum* (Kuchta & Abeles, 1985; Kuchta et al., 1986) und Phenyllactat durch die Phenyllactat-CoA-Dehydratase aus *Clostridium sporogenes* (Dickert et al., 2000). Weiterhin scheinen Ketyle an der Decarboxylierung von Hydroxyphenylacetat zu *p*-Kresol beteiligt zu sein (Andrei & Selmer, 2002).

6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, nähere Informationen zu den beteiligten Kofaktoren, den Eisen-Schwefel-Clustern sowie den Flavinen des Dehydratasesystems zu erhalten. Ergebnisse früherer Versuche ließen auf eine mögliche Beteiligung eines dritten Kofaktors schließen. Ziel war es, diesen putativen Kofaktor zu isolieren und – wenn möglich – näher zu charakterisieren.

Weiterhin sollte nach erfolgreicher Reinigung beider am Dehydratasesystem beteiligten Enzyme Kristallisationsansätze zur Komponente D durchgeführt werden. Ein zweiter Punkt war der Versuch einer Komplexbildung beider Komponenten mit anschließenden Kristallisationsansätzen.

Die Entwicklung eines Enzymaktivitätstests, mit dessen Hilfe direkte Kinetiken ermöglicht wurden, stellte ein weiterer Experimentalansatz dar. Infolge dessen sollten spektroskopische Methoden genutzt werden, um weitere Informationen zum Redoxmechanismus der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase zu erhalten.

Material und Methoden

1 Verwendete Materialien

1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders im Text angegeben, von den Firmen Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm) und Serva (Heidelberg) bezogen. Verwendete Enzyme und Koenzyme wurden von Boehringer Mannheim (Mannheim) oder Biomol (Hamburg) eingesetzt. Der Molekularmassenstandard für SDS-PAGE stammte von Pharmacia (Freiburg). Für die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde das Bio Rad-Reagenz von Bio-Rad-Laboratories (München) verwendet. Die Proteinbestimmung nach Pierce wurde mit dem BCA-Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) durchgeführt.

1.2 Gase

Stickstoff (99,99%) und Stickstoff-Wasserstoff-Gemisch (Formiergas 95% N₂ und 5% H₂) lieferte Messer Griesheim (Düsseldorf).

1.3 Säulenmaterial, Fertigsäulen und Geräte

Die verwendeten Fertigsäulen DEAE-Sepharose HR 26/10, Phenyl-Sepharose FF HR 26/10, Superdex 200 HR 26/10 sowie Q-Sepharose High Performance HiLoad™ 26/10 stammten von Pharmacia (Freiburg). Die Materialien für die selbstgepackten Blue-Sepharose HR 26/10 und Superdex-G25 (5 ml) stammten von Amersham Pharmacia (Schweden). HPLC-Säulen wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. StrepTactin-Sepharose-Säulen stammten von IBA GmbH, Göttingen.

Die verwendeten Anaerobenzelte lieferte Coy Laboratories, Ann Arbor MI, USA. Das für anoxische Aktivitätstests benutzte Photometer Ultrospec 4000 stammte von Pharmacia Biotech (Freiburg). Von dort wurde ebenfalls die für die Reinigung der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase, der Hilfsenzyme und der Glutaconyl-CoA-

Decarboxylase benötigten FPLC-Anlage bezogen. Beckman (München) lieferte die Ultrazentrifuge, Sorvall (München) die Kühltentrifugen. Die Analysen mittels HPLC wurden an einer Anlage der Firma Sykam (Gilching) durchgeführt.

1.4 Bakterien

1.4.1 *A. fermentans*

A. fermentans ATCC 25085 wurde unter anaeroben Bedingungen in der Regel in 50 ml Serumflaschen kultiviert. Für grössere benötigte Mengen wurde der Organismus von 1 l Kulturen auf 10 l Flaschen überimpft, um schliesslich in einem 100 l Fermenter gezogen zu werden. Dazu wurde ein Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Pro Liter Medium

Natriumglutamat \times H ₂ O	18 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumthioglykolat	1 g
Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 7)	10 ml
D-Biotin (2mg/ml)	50 μ l
Spurenelementenlösung (SL10)	1 ml

Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL10 pro Liter (Immhoff-Struckle & Pfennig, 1983):

HCl (25 %)	10 ml
FeCl ₂	1,5 mg
ZnCl ₂	70 mg
MnCl ₂	100 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
CoCl ₂	190 mg
CuCl ₂	2 mg
NiCl ₂	24 mg
NaMoO ₄	36 mg

Das Medium (1 l) wurde gekocht und anschließend 500 µl Sauerstoffindikator Resazurin (0,2 % Stammlösung) zugegeben. In Serumflaschen (120 ml) wurden jeweils 50 ml Medium abgefüllt und mit Gummistopfen und Aluminiumkrempe verschlossen. Die Flaschen wurden mit einer Vakuumpumpe bis zum Abkühlen entgast und anschließend die Atmosphäre durch mehrmaliges Be- und Entgasen mit N₂ gewechselt. Danach wurden die Flaschen autoklaviert. Für die Stammhaltung wurde das Medium mit 1% Inokulum überimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die hochgewachsenen Kulturen wurden bei 4 °C gelagert. Die Ausbeute eines 100 l Fermenters lag bei 250-300 g Feuchtzellen, welche bei -80 °C gelagert wurden.

1.4.2 *C. symbiosum* HB 25

Dieser Organismus wurde in dem gleichen Glutamatmedium, wie für *A. fermentans* verwendet, gezüchtet. Bei der 100 l Zucht konnten Ausbeuten zwischen 400 und 450 g Feuchtzellen erzielt werden. Die Zellen wurden ebenfalls portioniert und bei -80 °C gelagert. Wichtig in diesem Zusammenhang war die Beobachtung, dass das Ersetzen des Reduktionsmittels Natriumthioglykolat durch L-Cystein-HCl zu optisch veränderten Zellen geführt hat (schwarz statt beige, wahrscheinlich durch die Bildung von FeS hervorgerufen), aus denen nur wenig aktives Enzym gereinigt werden konnte (s. Ergebnisse).

1.4.3 *Escherichia coli* XL1-blue MRF'

Escherichia coli XL1-blue MRF' {Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173 end A1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15Tn10(Tet^r)]}, (Stratagen, Heidelberg) wurde bei 37 °C auf Standard I-Medium, das Ampicillin (100 µg/ml) enthielt, kultiviert. Dieser Stamm wurde zur Überproduktion der Komponente A aus *A. fermentans* verwendet. Als Stammhaltung dienten Agarplatten (Standard I-Medium mit 1,5 % Agar). Zur Produktion in 2 bis 10 l Fermentern wurde nur Flüssigmedium Standard I (25 g/l) verwendet.

2 Biochemische Methoden

Sämtliche Reinigungen und Aktivitätsmessungen wurden unter anoxischen Bedingungen unter Verwendung einer Formiergasatmosphäre (95 % N₂, 5 % H₂) durchgeführt; nur die Hilfsenzyme für den gekoppelten Test wurden unter oxischen Bedingungen gereinigt. Durch den Einbau eines Kühlsystems konnten die Temperaturen in den Anaerobenzelten (Coy Laboratories, Ann Arbor MI, USA) bei 15-20 °C gehalten werden. Die benötigten Puffer wurden aufgekocht, unter Vakuum abgekühlt und schliesslich im Anaerobenzelt über Nacht gerührt. Vor Gebrauch wurde Reduktionsmittel (DTT, 2 mM) zum Puffer gegeben. Alle verwendeten Geräte und andere Materialien wurden ebenfalls mindestens 24 h vor Gebrauch ins Anaerobenzelt eingeschleust.

2.1 Reinigung der Komponente D aus *C. symbiosum* und *A. fermentans*

Zur Reinigung der Dehydratase aus jeweils beiden Organismen wurden 25 g Feuchtzellen in anoxischem Aufschlusspuffer (20 mM Mops, pH 7,0, 2 mM Dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 1 mg DNase I) suspendiert. Diese Suspension wurde im Anaerobenzelt in eine French-Press-Kammer überführt, welche am Auslass mit einer mit Gummistopfen versehenen Serumflasche verschlossen wurde, so dass ein in sich geschlossenes anoxisches System entstand. Der Zellaufschluss erfolgte bei 1000 bar (20000 Psi) und wurde anschließend in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen gefüllt, anoxisch verschlossen und 90 Minuten bei 100.000 × g (Ultrazentrifuge von Beckman Instruments, München) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Filtration (0,45 µm-Filter) von Schwebepartikeln befreit und mit einer Flussrate von 3 ml/min mit Hilfe einer P1-Pumpe (Pharmacia) auf eine DEAE-Sepharose Fast-Flow-Säule (2,6 x 14 cm) aufgetragen. Diese Säule wurde vorher mit 100 ml 20 mM Mops, pH 7,0 + 1 M NaCl gewaschen, anschließend mit 150 ml 20 mM Mops, pH 7,0 äquilibriert. Nach dem Auftragen der Proteinlösung wurde die Säule mit 50 ml 20 mM Mops, pH 7,0 gewaschen und mit einem linearem 700 ml-Natriumchlorid-Gradienten von 0 bis 0,7 M

bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert. Komponente D eluierte bei 0,35 M Salz in einem Volumen von 50 ml.

Die aktiven Fraktionen der DEAE-Sepharose wurden vereinigt und mit gleichem Volumen einer 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung auf eine Konzentration von 1 M Salz eingestellt. Diese Lösung wurde auf eine Phenyl-Sepharose HiLoad-Säule (2,6 x 20 cm) mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde vorher mit 150 ml 20 mM Mops, pH 7,0 + 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibriert. Nach dem Auftragen der Proteinlösung wurde die Säule mit 50 ml des gleichen Puffers gewaschen, die Proteine mit einem linearem 550 ml- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten von 1 M bis 300 mM eluiert. Die Flussrate betrug ebenfalls 3 ml/min. Komponente D eluierte bei 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in einem Volumen von 60 ml. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (YM 30-Membran, Amicon, Witten) entsalzt und ankonzentriert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Q-Sepharose High Performance-Säule (1,5 x 16 cm) aufgetragen, welche vorher mit 50 ml 20 mM Mops, pH 7,0 + 1 M NaCl gewaschen, anschließend mit 80 ml 20 mM Mops, pH 7,0 äquilibriert wurde. Mit Hilfe eines linearen 400 ml-NaCl-Gradienten von 0 bis 0,5 M eluierte die zur Homogenität gereinigte Dehydratase bei 300 mM Salz in einem Volumen von 15 ml, wobei nur die aktivsten 9 ml ankonzentriert und entsalzt wurden. In den meisten Fällen konnte auf den Einsatz der dritten Säule verzichtet werden, da die ersten Dehydratasefraktionen der Phenyl-Sepharose ausreichend gereinigt vorlagen.

Komponente D wurde in einem Volumen von 500 μl anoxisch bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ über einen Zeitraum von mehreren Monaten gelagert.

2.2 Alternative Reinigungsmethode der Dehydratase aus *C. symbiosum*

Alternativ konnte die Komponente D aus *C. symbiosum* durch Kombination anderer Säulen gereinigt werden. Der Zellaufschluss und die Ultrazentrifugation erfolgte wie oben beschrieben. Der Überstand wurde durch Filtration (0,45 μm -Filter) von Schwebepartikeln befreit und mit einer Flussrate von 3 ml/min mit Hilfe einer P1-Pumpe auf eine DEAE-Sepharose Fast-Flow-Säule (2,6 x 14 cm) aufgetragen. Diese Säule wurde vorher mit 100 ml 20 mM Mops, pH 7,0 + 1 M NaCl gewaschen,

anschließend mit 150 ml 20 mM Mops, pH 7,0 äquilibriert. Nach dem Auftragen der Proteinlösung wurde die Säule für 50 ml mit 20 mM Mops, pH 7,0 gewaschen, die Proteine mit einem linearem 700 ml-Natriumchlorid-Gradienten von 0 bis 0,7 M eluiert. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 3 ml/min. Komponente D eluierte bei 0,35 M Salz in einem Volumen von 50 ml.

Die aktiven Fraktionen der DEAE-Sepharose wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (YM 30-Membran, Amicon, Witten) entsalzt und ankonzentriert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Blue-Sepharose High Performance-Säule (1,5 x 16 cm) aufgetragen, welche vorher mit 50 ml 20 mM Mops, pH 7,0 + 1 M NaCl gewaschen, anschließend mit 80 ml 20 mM Mops, pH 7,0 äquilibriert wurde. Mit Hilfe eines linearen 500 ml-NaCl-Gradienten von 0 bis 0,5 M eluierte Dehydratase bei 350 mM Salz in einem Volumen von 15 ml. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, entsalzt und auf 1 ml ankonzentriert. Jeweils 200 µl des Proteins wurden auf eine Superdex 200-Säule geladen.

Die zur Homogenität gereinigte Dehydratase (40 mg/ml) wurde gesammelt, ankonzentriert und in Aliquots zu 100 µl (300 - 500 µl gesamt) anoxisch bei -80 °C über einen Zeitraum von mehreren Monaten gelagert.

2.3 Test der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

2.3.1 Gekoppelter Aktivitätstest

Die benötigten Reagenzien wurden im Anarobenzelt mit anoxischem Wasser angesetzt. Zur photometrischen Aktivitätsbestimmung wurden Quartzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

Testansatz zur Bestimmung der Aktivität von Komponente D

	Konz. Test
Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0	50 mM
Triton X-100	0,1 %
NaCl	20 mM
Titan(III)citrat	0,15 mM

ATP	0,15 mM
MgCl ₂	5 mM
Acetyl-Phosphat	0,1 mM
CoA-SH	0,1 mM
NAD	1 mM
DTT	5 mM
Glutaconyl-CoA-Decarboxylase	6 mU
Hilfsenzyme (0,2 mg)	20 µl
(<i>R</i>)-2-Hydroxyglutarat	0,25 mM
Komponente D	
Komponente A	

Der Testansatz wurde für 5 Minuten vorinkubiert und durch Zusatz von Komponente D, A oder (*R*)-2-Hydroxyglutarat gestartet. Dabei wurde die Bildung von NADH ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Ti(III)citrat (10 mM) wurde ebenfalls unter anoxischen Bedingungen hergestellt. Dafür wurden 216 µl einer Titan(III)chlorid-Lösung (15 % in 10 % HCl) in 50 mM Tris/HCl und 50 mM Natriumcitrat (Endvolumen 25 ml) gegeben. Durch Zugabe von NaOH wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

2.3.2 Direkter Aktivitätstest

Weitere Aktivitätsmessungen der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase, Komponente D und Komponente A, wurden ebenfalls unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Die benötigten Reagenzien wurden im Anarobenzelt mit anoxischem Wasser angesetzt. Zur photometrischen Aktivitätsbestimmung wurden Quatzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

Testansatz zur Bestimmung der Aktivität von Komponente D

	Konz. Test
Tris/HCl Puffer, pH 8,0	50 mM

Titan(III)citrat	0,15 mM
ATP	0,35 mM
MgCl ₂	0,50 mM
(<i>R</i>)-2-Hydroxyglutarayl-CoA	0,10 mM
Komponente D	
Komponente A	

Dieser Testansatz wurde in Abhängigkeit der zugegebenen Menge von Komponente A zwischen 2 und 40 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA gestartet. Dabei wurde die Bildung von (*E*)-Glutaconat ($\epsilon_{290} = 2,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 290 nm gemessen, da das Produkt über eine Doppelbindung verfügt und somit in diesem Bereich absorbiert.

2.4 Reinigung der Hilfsenzyme für den gekoppelten Aktivitätstest

2.4.1 Reinigung des Enzympools aus *A. fermentans*

Zur Reinigung der Hilfsenzyme aus *A. fermentans* wurden 25 g Feuchtzellen in Aufschlusspuffer (20 mM KPP, pH 7,0, 1 mM PMSF, 5 mM MgCl₂, 1 mg DNase I) suspendiert. Diese Suspension wurde aerob in eine French-Press-Kammer überführt. Der Aufschluss erfolgte bei 1000 bar Überdruck. Der Zellaufschluss wurde anschließend in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen überführt und 90 Minuten bei $100.000 \times g$ (Ultrazentrifuge von Beckman Instruments, München) zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde für die Reinigung der Decarboxylase verwendet. Der Überstand wurde nach zweimaliger Ammoniumsulfatfällung (50 % und 80 %) bei $10.000 \times g$ für 30 min zentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet wurde in 20 mM KPP, pH 7,0 aufgenommen und über Nacht in 5 l 20 mM KPP, pH 7,0 dialysiert. Diese Proteinlösung wurde durch Filtration (0,45 µm-Filter) von Schwebepartikeln befreit und mit einer Flussrate von 3 ml/min mit Hilfe einer P1-Pumpe auf eine DEAE-Sepharose Fast-Flow-Säule (2,6 x 14 cm) aufgetragen. Diese Säule wurde vorher mit 100 ml 20 mM KPP, pH 7,0 + 1 M NaCl gewaschen, anschließend mit 150 ml 20 mM KPP, pH 7,0 äquilibriert. Nach dem Auftragen der Proteinlösung wurde die Säule für 50 ml mit 20 mM KPP, pH 7,0 gewaschen, die Proteine mit einem linearem 500 ml-

Natriumchlorid-Gradienten von 0 bis 1 M eluiert. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 3 ml/min. Fraktionen, welche erfahrungsgemäß die Dehydratase enthielten (Kontrolle durch SDS-PAGE), wurden nicht in den Enzympool übernommen.

Der Pool wurde auf 15 ml ankonzentriert und in Aliquots zu 200 µl bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Aktivitätsbestimmungen der CoA-Transferasen

Zur Bestimmung der CoA-Transferase-Aktivitäten wurde der sogenannte DTNB-Assay durchgeführt. Alle Komponenten wurden in der Küvette gemischt und durch Zugabe der Hilfsenzyme gestartet. Dabei wurde die Bildung einer gelben Farbe bei einer Wellenlänge von 410 nm ($\epsilon_{410} = 14,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Riddles et al., 1983) verfolgt, welche auf eine Reaktion von entstandenem CoA-SH mit DTNB zurückzuführen ist.

Testansatz zur Bestimmung der CoA-Transferase-Aktivität

Konz. Stammlösung	Einsatz im Assay µl
1 M KPP, pH 7,0	100
2 M Natriumacetat	100
0,1 M Oxalessigsäure	10
DTNB (20 mg/ml in KHCO_3 gelöst)	20
10 mM Glutaryl-CoA	20
Citrat-Synthase (2 mg/ml)	2
Hilfsenzyme (25 mg/ml)	10

2.4.3 Reinigung der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase

Das bei der Hilfsenzymreinigung erhaltene Zelltrümmerpellet wurde für die Reinigung der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase in 20 mM KPP, pH 7,0 suspendiert und ein weiteres Mal für 90 min bei $100.000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde solange mit Waschpuffer (20 mM KPP, pH 7,0, 2 % Triton X-100, 0,5 M NaCl, 10 mM EDTA)

solubilisiert, bis die Proteinkonzentration 1-2 mg/ml betrug. Danach wurde die Lösung für 15 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf eine Avidin-Sepharose-Säule (5 ml) mit einer Flussrate von 2 ml/min geladen (Buckel & Semmler, 1983). Die Säule wurde vorher mit 20 mM KPP, pH 7,0 + 1 % Triton X-100 + 0,5 M NaCl äquilibriert. Nach Beladen der Säule wurde diese mit 60 ml des gleichen Puffers gewaschen, anschließend mit 100 ml 20 mM KPP, pH 7,0 + 0,1 % Triton X-100. Die Decarboxylase wurde mit 20 mM KPP, pH 7,0 + 0,1 % Triton X-100 + 1 mM Biotin von der Säule eluiert.

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (YM 30-Membran) auf ein Volumen von 5 ml ankonzentriert. Die aliquotierten Proben konnten über einen Zeitraum von mehreren Jahren ohne nennenswerten Aktivitätsverlust bei -80 °C gelagert werden.

2.4.4 Aktivitätsbestimmung der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase

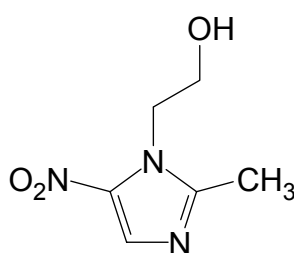
Die Aktivitätsbestimmungen der Decarboxylase wurden unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Durch Zugabe von 1 mM Natriumglutaconat wurde die Reaktion gestartet und die Bildung von NADH ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Testansatz zur Bestimmung der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase-Aktivität

Konz. Stammlösung	Einsatz im Assay μl
0,5 M KPP, pH 7,0 + 1 % Triton X-100	100
1 M NaCl	20
0,1 M DTE + 0,1 M EDTA	20
0,1 M NAD ⁺	10
0,1 M Glutaconat	10
CoA-SH (10 mg/ml)	10
10 mM Acetyl-Phosphat	10
Hilfsenzyme (25 mg/ml)	10
Decarboxylase	10

2.5 Der Effekt von Metronidazol auf das Dehydratasesystem

Das Antibiotikum Metronidazol wird zur Bekämpfung von Infektionen mit anaeroben Organismen eingesetzt. Da das Dehydratasesystem als Schlüsselenzym bei vielen Clostridien gilt, soll der Effekt dieses Antibiotikums untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen sowohl im gekoppelten als auch im direkten Aktivitätstest eingesetzt. Die Aktivitätsmessungen wurden wie unter 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben durchgeführt.



Metronidazol

2.6 Synthese und Reinigung von rekombinanter Komponente A aus *A. fermentans*

E. coli XL1-blue MRF' wurde bei 37 °C auf Standard I-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, kultiviert. Diese Vorkultur diente als Inokulum für eine 10 l Kultur. Nach Animpfen des 10 l Fermenters wurde dieser bei 30 °C inkubiert, die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,3 mit 50 µg/l Anhydrotetracyclin (AHT) induziert und nach weiteren drei Stunden Wachstum abgeerntet. Die Zellen wurden in 20 mM Mops, pH 7,0 + 2 mM Dithiothreitol + 300 mM NaCl + 10 mM MgCl₂ + 1 mg DNase I suspendiert und mit einer FrenchPress-Zelle unter anoxischen Bedingungen aufgeschlossen. Nach Ultrazentrifugation bei 100.000 × g für 90 min wurde der Überstand mittels eines 0,45 µm-Sterilfilters von Schwebeteilchen befreit. Anschließend wurde die Proteinlösung mit einer P 1-Pumpe auf eine 10 ml StrepTactin-Sepharose-Affinitätsäule bei einem Fluss von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde vorher mit 20 mM Mops, pH 7,0 + 2 mM DTT + 300 mM NaCl + 10 mM MgCl₂ (Puffer A) äquilibriert. Nach Beladen der Säule

wurde diese mit Puffer A + 2 mM ADP gewaschen, die Elution der Komponente A erfolgte mit Puffer A + 2 mM ADP + 3 mM *D*-Desthiobiotin.

Für weitere Versuche konnte Komponente A direkt verwendet werden, für EPR-Experimente musste das Enzym je nach Bedarf durch Ultrazentrifugation (YM10-Membran) ankonzentriert werden. Komponente A konnte anoxisch bei 4 °C für max. 10 Tage gelagert werden; Schockfrieren und eine Lagerung bei -80 °C konnte nur im späteren Verlauf der Proteinreinigungen erfolgreich angewandt werden. Das Einfrieren und die Lagerung der Proben in flüssigem Stickstoff bei 77 K wurde für die spätere Kristallisation gewählt.

2.7 Proteinbestimmung

2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf dem Prinzip, dass sich bei Anlagerung vom Farbstoff Coomassie Brilliantblau an Protein dessen Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm verschiebt. Zur Durchführung der Proteinbestimmung wurde der Biorad-Microassay (Bio-Rad-Laboratories, München) mit einer Verdünnung (Wasser) von 1:5 verwendet. Als Standard diente Rinderserumalbumin, welches bis zu einer Konzentration von 10 µg eingesetzt wurde. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde in 50 µl angesetzt und anschließend mit dem verdünnten Farbstoff auf 1 ml aufgefüllt und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen.

2.7.2 Proteinbestimmung nach Pierce

Der Pierce-BCA-Macro-Assay (Smith et al., 1985) basiert auf der Reaktion von Proteinen, unter alkalischen Bedingungen Cu^{2+} -Ionen zu komplexieren und zu reduzieren. Durch Zusatz von Bicinchoninsäure (2,2'-bichinolin-4,4'-dicarbonsäure-Dinatriumsalz) wird Cu^+ komplexiert, was mit einer Farbentwicklung bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm einhergeht. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde Reagentienmix (2 ml) mit je 100 µl Probe bzw.

Standardprotein (20-1000 µg) gemischt, bei 60 °C für 30 min inkubiert und die Absorption bei 562 nm gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

2.8 Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

Zur Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen (Fish, 1988) wurden folgende Lösungen verwendet:

7,5 % Ammoniumacetat

2,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

4 % Ascorbinsäure, frisch

1 % HCl

1,5 % Ferrozin, 3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonat)-1,2,4-Triazin,
Dinatriumsalz, Eisenchelator

0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, frisch, Eisenstandard

Nicht-Häm-Eisen wurde mit Salzsäure aus dem Protein freigesetzt und nach Reduktion mit Ascorbinsäure zu Fe^{2+} kolorimetrisch als Ferrozin-Komplex nachgewiesen. Dazu wurden die Proben bzw. der Standard auf 100 µl verdünnt und mit 100 µl 1 % HCl versetzt und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und nacheinander mit folgenden Lösungen versetzt:

500 µl Ammoniumacetat, 100 µl Ascorbinsäure, 100 µl SDS und 100 µl Ferrozin. Nach Zentrifugation für 10 min bei $9000 \times g$ wurde die Extinktion bei 593 nm gegen Wasser gemessen.

2.9 Bestimmung von säurelabilem Schwefel

Zur Bestimmung von säurelabilem Schwefel (Cline, 1969) wurden folgende Lösungen verwendet:

1 % Zinkacetat, frisch

7 % NaOH

0,1 % N,N'-Dimethyl-p-phenylendiammoniumchlorid (DMPD) in 5 M HCl

10 mM FeCl₃ in 1 M HCl

Der zu bestimmende Schwefel wurde aus den Eisen-Schwefel-Clustern mit NaOH hydrolysiert und als Zinksulfid gebunden. Nach Ansäuern reagiert freigesetztes H₂S mit DMPD, wobei Methylenblau entsteht. Dieser Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum bei 670 nm und kann daher photometrisch nachgewiesen werden.

Probe bzw. Sulfidstandard (0-50 nmol) wurden auf 200 µl verdünnt und anschließend mit 600 µl Zinkacetat gemischt. Nach Zugabe von 50 µl NaOH und leichtem Mischen, wurde der Reaktionsansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterer Zugabe von jeweils 150 µl DMPD und FeCl₃ wurde der Ansatz für mindestens 30 sec gevortext. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für 5 min bei 9000 × g zentrifugiert und die Extinktion bei 670 nm gegen Wasser gemessen.

2.10 Jodometrische Bestimmung der Sulfidkonzentration

Die Sulfidkonzentration einer Lösung kann mit Hilfe der Jodometrie bestimmt werden. Hierbei nutzt man die Violettfärbung (durch enthaltenes Kaliumjodid) der I₂-Lösung, welche bei vollständiger Reduktion des Jod zu Jodid verschwindet und somit das Ende der Titration erkennen lässt. Na₂S wird mit Jod-Lösung versehen, der Überschuss an Iod wird durch Rücktitration mit Natriumthiosulfat-Lösung ermittelt. Durch Einstellen der Maßlösung wurde eine 2 mM Na₂S-Lösung angesetzt, ein Teil dieser Lösung in 1 ml Jod-Lösung pipettiert. Der Jod-Überschuss wurde mit Natriumthiosulfat rücktitriert und die Sulfidkonzentration anhand des weniger verbrauchten Thiosulfats berechnet.

2.11 Bestimmung von Flavinen

Die im Protein gebundenen Flavine wurden mit HPLC charakterisiert. Dafür wurde die Enzymlösung für 20 min bei 75 °C inkubiert, das denaturierte Protein durch Zentrifugation entfernt. Der gelb gefärbte Überstand wurde mit 1 N HCl auf pH 3,0 eingestellt und auf eine hydrophobe RP-18 Säule (5 µm) aufgetragen. Die Proben

wurden isokratisch mit 25 % Methanol in 50 mM Ammoniumformiat eluiert (Eikmanns & Buckel, 1990). Riboflavin, FMN und FAD (je 10 µM) dienten als Standard, welche vorher ebenso behandelt wurden wie die Proteinprobe. Die Flussrate betrug bei allen Läufen 1 ml/min und die Detektion der Flavine erfolgte bei 266 nm.

2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit von Proteinen und um die apparente molekulare Masse der Untereinheiten zu ermitteln, wurden 15 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele angefertigt (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde mit einer Mini Protean II Elektrophoreseapparatur (Bio-Rad-Laboratories, München) durchgeführt. Die Gelgröße betrug $9 \times 7 \times 0,3$ cm.

Zusammensetzung der SDS-Gele

Konz. Stammlösung	Trenngel	Sammelgel
1 M Tris/HCl, pH 8,8	3000 µl	
1 M Tris/HCl, pH 6,8		470 µl
H ₂ O	1370 µl	2900 µl
10 % SDS	85 µl	40 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %/1,6 %)	2750 µl	585 µl
5 % TEMED	85 µl	40 µl
10 % Ammoniumperoxodisulfat	115 µl	80 µl

Die zu untersuchenden Proben wurden vor der Elektrophorese mit 1-2 Teilen SDS-Probenpuffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10 % Glycerin, 10 % Mercaptoethanol, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau) versetzt und für mindestens 10 min aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren. Pro Spur wurden 10-15 µl Proteinproben aufgetragen.

Als Molekularmassenstandard diente eine Mischung aus Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α-Lactalbumin (14,4 kDa). Als Elektrodenpuffer

diente 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,8. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 150 mV so lange durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Marker das Ende des Gels erreicht hatte. Dieses wurde anschließend zur Fixierung der Proteine mit Coomassie Brilliantblau R-250 gefärbt. Dafür wurde das Gel in einer 0,1 %igen Lösung des Farbstoffes in Methanol/Wasser/Eisessig (4:5:1) kurz aufgeköcht und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nichtgebundener Farbstoff wurde mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser/Eisessig (4:5:1) durch Aufkochen und Inkubation über Nacht auf einem Schüttler entfernt.

2.13 Synthese von CoA-Estern

2.13.1 Synthese von Acetyl-CoA und Glutaryl-CoA

Als CoA-Donor für die Synthese weiterer CoA-Ester diente Acetyl-CoA. Hierzu wurden 43 mg Coenzym A unter Zugabe von 20 mg KHCO_3 in 700 μl Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden 7 μl Acetanhydrid in 700 μl Acetonitril zugegeben und gut durchmischt. Nach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde der pH des Reaktionsgemisches mit 1 M HCl auf pH 2,0 eingestellt. Anschließend wurde das Gemisch gefriergetrocknet und im trockenen Zustand bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Die Synthese von Glutaryl-CoA erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Als CoA-Akzeptor diente jedoch Glutarsäureanhydrid.

2.13.2 Synthese von (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA

Die Synthese der Substrate der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wurde enzymatisch durchgeführt. Als Hilfsenzym diente die rekombinant synthetisierte Glutaconat-CoA-Transferase aus *A. fermentans* (Buckel & Liedtke, 1986). 1 mM Acetyl-CoA wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0 mit 50 mM D- α -Hydroxyglutarylsäure nach Zugabe von 50 mM KHCO_3 aufgenommen. Nach Zugabe von 50 μg Glutaconat-CoA-Transferase wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert des Reaktionsgemisches mit 1 M HCl auf pH 2,0 eingestellt, die Lösung durch

Zentrifugation mit Centricon YM30 bei 4 °C von der Glutaconat-CoA-Transferase befreit. Das Gemisch wurde gefriergetrocknet und im trockenen Zustand bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.13.3 Synthese von (*E*)-Glutaconyl-CoA

Die Synthese von (*E*)-Glutaconyl-CoA erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie unter 2.12.2 beschrieben. Als CoA-Akzeptor diente in diesem Fall jedoch 50 mM Glutaconsäure in 50 mM KHCO₃-Lösung.

2.14 Bestimmung der Konzentration von CoA-Estern mit gekoppeltem DTNB-Test

Mit Hilfe des sogenannten DTNB-Assay können die Konzentrationen sämtlich synthetisierter CoA-Ester durch eine photometrische Endpunktbestimmung bei 412 nm ermittelt werden. Dabei werden die rekombinant synthetisierte Glutaconat-CoA-Transferase aus *A. fermentans* sowie die käuflich zu erwerbende Citrat-Synthase als Hilfsenzyme eingesetzt.

Zusammensetzung des DTNB-Assay

Konz. Stammlösung	Einsatz im Assay µl
1 M KPP, pH 7,0	100
2 M Natriumacetat	100
0,1 M Oxalessigsäure	10
DTNB (20 mg/ml in KHCO ₃ gelöst)	20
Citrat-Synthase (2 mg/ml)	2
Glutaconat-CoA-Transferase (15 mg/ml)	5
CoA-Ester/Probe	2-5
	ad 1000 µl H ₂ O

Der Ansatz wurde ohne Citrat-Synthase und Glutaconat-CoA-Transferase gemischt und der Extinktionswert als Nullwert notiert. Durch Zugabe des CoA-Esters konnte freies Coenzym A mit DTNB reagieren und somit der Gehalt bestimmt werden. Durch Zugabe von Citrat-Synthase konnte der Gehalt von Acetyl-CoA bestimmt werden, da dieses mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert. Das freigewordene Coenzym A reagierte erneut mit DTNB. Die abschließende Zugabe von Glutaconat-CoA-Transferase wandelt die CoA-Ester in Acetyl-CoA um, welches wie eben beschrieben weiter reagiert. Mit der Extinktionsdifferenz und dem molaren Extinktionskoeffizienten von 2-carboxy-4-nitrothiopenol ($\epsilon_{410} = 14,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kann die Konzentration der CoA-Ester bestimmt werden.

2.15 Bestimmung der K_m -Werte für (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA und (E)-Glutaconyl-CoA

Die Bestimmungen der K_m -Werte für (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA und (E)-Glutaconyl-CoA der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wurden ebenfalls unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Die benötigten Reagenzien wurden im Anaerobenzelt mit anoxischem Wasser angesetzt. Zur photometrischen Aktivitätsbestimmung wurden Quartzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 500 μl verwendet.

Testansatz zur Bestimmung der K_m -Werte von Komponente D

	Konz. Test
Tris/HCl Puffer, pH 8,0	50 mM
Titan(III)citrat	0,15 mM
ATP	0,35 mM
MgCl ₂	50 μM
CoA-Ester	
Komponente D	
Komponente A	
	ad 500 μl H ₂ O

Für diese Bestimmungen wurde ein molares Verhältnis von Dehydratase zu Komponente A von 1:1 gewählt. Alle Testansätze wurden für 2 min bei Raumtemperatur präinkubiert, die Reaktion durch Zugabe des jeweiligen CoA-Esters mit unterschiedlichen Konzentrationen gestartet. Die mathematische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Lineweaver-Burk Darstellung.

2.16 Bestimmung der ATPase-Aktivität der Komponente A

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgte ebenfalls unter anoxischen Bedingungen. Das bei ATP-Hydrolyse freigesetzte ADP kann durch eine gekoppelte enzymatische Bestimmung quantifiziert werden und so auf eine vorhandene ATPase-Aktivität geschlossen werden. Dabei wird entstandenes ADP mit Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvat-Kinase zu Pyruvat und ATP umgesetzt. Die Laktat-Dehydrogenase reduziert das Pyruvat zu Laktat, wobei NADH zu NAD^+ oxidiert wird. Diese Oxidation kann man photometrisch durch die Abnahme der Extinktion bei 340 nm verfolgen.

Testansatz zur Bestimmung der ATPase-Aktivität

Konz. Stammlösung	Einsatz im Assay μl
1 M Tris/HCl, pH 8,0	50
100 mM Phosphoenolpyruvat	10
100 mM ATP	10
10 mM NADH	10
Pyruvat-Kinase	2 U
Laktat-Dehydrogenase	2 U
Probe	10
	ad 1000 μl H_2O

Über den molaren Extinktionskoeffizienten von NADH ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kann die Volumenaktivität bzw. die spezifische Aktivität bestimmt werden.

2.17 Bestimmung des Molybdängehaltes von Komponente D

2.17.1 Chemische Bestimmung

Zur Bestimmung von Molybdän (Johnson, 1988) wurden folgende Lösungen verwendet:

- 30 % HCl
- 5 % Eisensulfat in H_2SO_4
- 50 % Natriumjodid, frisch
- 10 % Natriumsulfit, frisch
- 10 % Thioharnstoff, frisch
- 50 % Weinsäure
- 0,2 % Toluol-3,4 dithiollösung
- Isoamylacetat

Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit 100 µl konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, anschließend abgekühlt und mit 100 µl konzentrierter Salpetersäure versehen. Dieses Reaktionsgemisch wurde solange erhitzt, bis eine Rauchentwicklung sichtbar wurde und die Verkohlungen verschwanden. Dieser Schritt wurde nach Zugabe von 100 µl 30 %igem Wasserstoffperoxyd wiederholt, um die konzentrierte Schwefelsäure abzdampfen. Nach Zugabe von 1 ml Wasser wurden Reste der Schwefelsäure durch erneutes Aufkochen abgedampft.

Den Proben wurde 3 ml 30 %ige HCl, 100 µl FeSO_4 und 100 µl NaI hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde tropfenweise Natriumsulfit hinzugegeben bis die charakteristische Jodfärbung verschwand. Anschließend wurden 400 µl Thioharnstoff, 100 µl Weinsäure und 400 µl Dithiollösung zum Reaktionsgemisch gegeben, für 30 sec gevortext und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 2,5 ml Isoamylacetat und gutem Durchmischen der Lösung wurde eine Färbung beobachtet, welche sich im Alkohol löst und somit leicht abgetrennt werden kann. Abschließend wurde die Extinktion des Alkohols bei 680 nm gegen Wasser gemessen.

2.17.2 Physikalische Bestimmung

Eine weitere Möglichkeit, Metallionen nachzuweisen, ist die Bestimmung mit Hilfe eines Atomic Absorption Spektrophotometers (Perkin-Elmer AS-60/70, Zeeman/3030) (Johnson, 1988). Hierbei macht man sich das Phänomen der Resonanzabsorption zu Nutze, wobei ein durch ein angeregtes Atom emittiertes Lichtquant von einem nicht angeregten Atom des gleichen Elements absorbiert werden kann. Die zu bestimmende Probe (20 µl) der 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen wurde dabei auf 1800 °C vorgeheizt, anschließend bei 2650 °C unter stetem Durchströmen von Argongas gemessen. Dabei wurde das Licht einer Molybdänlampe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 313.3 \text{ nm}$ verwendet. Als Standard diente eine Molybdän Atomspektroskopie-Standardlösung (1 g/l, Fluka) mit einer maximalen Konzentration von 500 pg pro Messung.

2.18 Isolierung eines putativen molybdänhaltigen Kofaktors aus Komponente D

Da in den meisten bisher bekannten molybdänhaltigen Enzymen das Metallion in einem Pterinkofaktor gebunden vorliegt, wurde im Folgenden versucht, einen putativen Kofaktor der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase mit bekannten Isolierungsmethoden für Molybdopterin zu erhalten (Gladyshev & Lecchi, 1996). 100 µg 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase (100 µl) wurden für 15 min mit 200 µl 8 M Guanidiniumhydrochlorid inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl 1 M NaBH₄ (in 50 mM KOH) erfolgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Diesem Reaktionsgemisch wurde abschließend 80 µl 0,2 M Jodacetamid zugefügt und für weitere 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch Zentrifugation wurde die Lösung von denaturiertem Protein befreit (YM 10-Membran). Proben dieser Lösung wurde mittels HPLC analysiert und auf eine hydrophobe RP-18 LiChrospher® 100-Säule (5 µm) aufgetragen. Die Proben wurden isokratisch mit 3 % Methanol in 50 mM Ammoniumacetat eluiert (Gladyshev & Lecchi, 1996). Die Flussrate betrug bei allen Läufen 1 ml/min und die Detektion des Kofaktors erfolgte bei 278 nm.

Für weitere Untersuchungen wurden die Extraktionen nach Laukel et al. (2003) und Meckenstock et al. (1999) durchgeführt.

Im ersten Fall wurde 1 mg 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase mit HCl auf pH 2,5 eingestellt und mit 1 % I₂ + 2 % KI (1:20) versehen. Nach Kochen der Probe für 30 min wurde das Reaktionsgemisch durch Ultrafiltration (YM 10-Membran) von denaturiertem Enzym befreit.

Im zweiten Fall wurde 1 mg 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase mit KMnO₄ (55 mM in 0,1 M NaOH) versetzt und für 15 min gekocht. Nach Zugabe von 2 Volumen Ethanol wurde das Reaktionsgemisch durch Ultrafiltration (YM 10-Membran) von denaturiertem Enzym und MnO₂ befreit.

2.19 Charakterisierung des putativen molybdänhaltigen Kofaktors aus Komponente D

2.19.1 Charakterisierung mittels HPLC und UV-vis Spektroskopie

Der nach der Methode von Gladyshev & Lecchi isolierte Kofaktor wurde mittels HPLC analysiert und auf eine hydrophobe RP-18 LiChrospher® 100-Säule (5 µm) aufgetragen. Die Proben wurden isokratisch mit 3 % Methanol in 50 mM Ammoniumacetat eluiert (Gladyshev & Lecchi, 1996). Die Flussrate betrug bei allen Läufen 1 ml/min und die Detektion des Kofaktors erfolgte bei 280 nm. Weiterhin wurde die Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor (Excitation 380 nm, Emission 520 nm) durchgeführt.

Die Bestimmung eines UV-Spektrums wurde an einem Diodenarray Photometer HP UV-visible ChemStation 8453 (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) mit einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Dabei wurde eine Wellenlänge von 200 nm bis 950 nm gescannt.

2.19.2 Charakterisierung mittels Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums erfolgte an einem Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrophotometer (Varian, Darmstadt). Die zentrifugierten Proben wurden direkt in eine Fluoreszenzküvette (d = 1cm) überführt und gemessen. Dabei wurde bei

einer Wellenlänge von 380 nm das Molekül angeregt und das Emissionsspektrum von 400 nm bis 700 nm aufgenommen. Als Kontrollen wurde FMN (1 μ M im Test) und Pterin-6-carbonsäure (1 μ M im Test) eingesetzt.

2.20 Darstellung eines AlF_4^- -induzierten Komplexes der Komponente D und Komponente A

2.20.1 Aufreinigung und Charakterisierung des Komplexes mittels Gelfiltration, Nativgel und SDS-PAGE

Zur Komplexbildung der beiden Enzyme wurde 200 μ g 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase mit 240 μ g Aktivator in Anwesenheit von 1 mM AlF_3 und 10 mM KF für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Ansatz zur Komplexbildung von Komponente A und D

Konz. Stammlösung	Einsatz im Test μ l
1 M Tris/HCl, pH 8,0	100
0,5 M MgCl_2	5
10 mM Natriumdithionit	10
0,5 M DTT	5
0,5 M ATP	10
0,1 M KF	100
0,1 M AlF_3	10
Dehydratase:Aktivator molar	1:1
ad 1000 μ l H_2O	

Nach der Inkubationszeit wurde eine Probe von max. 100 μ g Protein mittels Gelfiltration analysiert. Als Säule wurde eine Superdex 200 HR 30/10 mit 20 mM Mops, pH 7,0 + 100 mM KCl betrieben. Die Flussrate betrug 0,3 ml/min. Als Kontrollen wurden jeweils die beiden Proteine einzeln und als Gemisch aufgetragen und die Retentionszeit detektiert.

Zur Eichung der Gelfiltration dienten folgende Enzyme: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsin (25 kDa) und Vitamin B₁₂ (1,4 kDa).

Des weiteren wurden Komponente A und D sowie der gebildete Komplex mittels Nativgel und SDS-PAGE untersucht.

Zur Aufreinigung des gebildeten Komplexes konnte ebenfalls eine Superdex 200 HR 30/10 verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit stellte die Reinigung mittels StrepTactin-Sepharose Affinitätschromatographie dar. Komponente A konnte auch im komplexierten Zustand an das Material binden und mittels *D*-Desthiobiotin (s. 2.6 Material und Methoden) eluiert werden. Die einfachste und schnellste Methode der Reinigung stellte allerdings der Einsatz von Ultrafiltration (YM 100-Membran) dar und wurde im weiteren Verlauf bevorzugt angewandt.

2.20.2 Aktivitätsbestimmung des AlF_4^- -induzierten Komplexes der Komponente D und Komponente A

Die Aktivitätsbestimmung des gebildeten Komplexes wurde mit Hilfe des direkten Enzymtests durchgeführt und diente sowohl als Kontrollexperiment der Komplexbildung als auch als Überprüfung der Stabilität des gebildeten Komplexes. Dabei wurde der folgende Testansatz für jeweils zwischen 0 und 40 min inkubiert und nach 0, 10, 20, 30 und 40 min die Aktivität durch Zugabe von (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA gemessen.

Testansatz zur Komplexbildung

Konz. Stammlösung	Einsatz im Assay μl
0,5 M Tris/HCl, pH 8,0	50
0,5 M MgCl_2	5
0,5 M DTT	5
0,1 M ATP	2
10 mM Ti(III)citrat	5
0,1 M KF	50
0,1 M AlF_3	5

Dehydratase:Aktivator molar

1:0,1

ad 500 µl H₂O

Die Aktivitätsmessung wurde mit 40 µM (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA gestartet.

2.20.3 EPR-Experimente mit Komponente D, Komponente A und AlF₄⁻-induziertem Komplex beider Komponenten

Alle Proben wurden im Anaerobenzelt in Quarzröhrchen mit einem Innendurchmesser von 3-4 mm und einer Wandstärke von ca. 0,5 mm gefüllt. Das Volumen betrug jeweils 1 ml und konnte mit einer Eppendorfpipette mit flexibler Spitze in die Röhrchen überführt werden. Das Einfrieren und die Lagerung der Proben wurde in flüssigem Stickstoff bei 77 K durchgeführt.

Die Aufnahme der EPR-Spektren erfolgte an einem Bruker ESP300 EPR Spektrometer mit einem Standard TE102 Resonanzkörper für X-Band (~9 GHz). Die Temperatur im Bereich von 10 K wurde mit Hilfe eines Oxford Instruments ESR900 bzw. ER-4112HV Helium-Fluss Kryostaten reguliert. Die Auswertung der erhaltenen Spektren wurde mit dem Bruker WINEPR Programm (Version 2.11) durchgeführt.

Bei der Aufnahme der EPR-Spektren wurde versucht, die Mikrowellenleistung und die Verstärkerstufe so aufeinander abzustimmen, um ein bestmögliches Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten.

2.21 Ansätze zur Kristallisation der Komponente D aus *C. symbiosum*

Experimente zur Kristallisation der Komponente D wurden mit Hilfe von Kristallisations-Kits der Firma Hampton Research, CA, USA in Kooperation mit dem Labor von Prof. Huber und Dr. Albrecht Messerschmitt am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt. Erste Kristalle konnten anoxisch mit der Sitting drop-Methode gezüchtet werden. Dabei wurde in sogenannte Greiner-Platten (CrystalQuick™ 96 Well Standard Profile - Flat Bottom) jeweils 100 µl des Kristallisationspuffers (Index, PEG/Ion, SaltRx, CrystalLight) als Reservoir vorgelegt. Proteinlösung wurde mit dieser Mutterlauge 1:2 verdünnt (Gesamtvolumen 4 µl,

Proteinkonzentrationen im Tropfen variierten zwischen 25 und 5 mg/ml) und auf die dafür vorgesehene Position aufgetragen. Die Ansätze wurden mit selbstklebender Klarsichtfolie verschlossen und bei 20 °C im Anaerobenzelt gelagert.

2.22 Ansätze zur Kristallisation des AlF_4^- -induzierten Komplexes der Komponente D und Komponente A aus *C. symbiosum* und *A. fermentans*

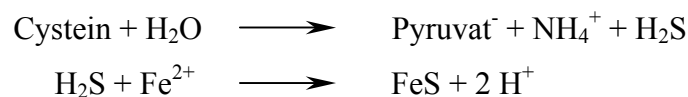
Experimente zur Kristallisation des AlF_4^- -induzierten Komplexes der Komponente D und Komponente A erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.21 beschrieben. Zur Verfeinerung der gefundenen positiven Bedingungen wurden definierte Kristallisationspuffer hergestellt und mit Cryschem Plates™ (4 × 6) verwendet. Hierbei wurde ein Volumen von 300 µl im Reservoir vorgelegt.

Erhaltene Kristalle wurden mittels SDS-PAGE auf die Zusammensetzung ihrer Untereinheiten überprüft.

Ergebnisse

1 Aufzucht von *Clostridium symbiosum*

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Dehydratasesysteme stammten ausschließlich aus *A. fermentans* und *C. symbiosum*. Die Aufreinigung der Komponente D aus *C. symbiosum* stellte uns lange vor große Probleme. Ein Grund dafür kann in der Kultivierung der Zellen liegen. Mit Beginn der Arbeit wurde eine Großzucht der Zellen in einem 100 l - Fermenter durchgeführt. Dabei wurde L-Cystein-HCl dem Medium als Reduktionsmittel zugefügt. Die anschließenden Reinigungen führten zum vollständigen Verlust des Enzyms, in der Regel bei Einsatz der hydrophoben Interaktionschromatographie. Auch die Aufzucht von neuen Zellen brachte kein anderes Ergebnis. Erst durch den Ersatz von L-Cystein-HCl durch Natriumthioglykolat konnte homogenes Protein gereinigt werden. Dabei war zu beobachten, dass der Einsatz von L-Cystein-HCl zu optisch veränderten, schwarzen Zellen führte. Dies könnte durch die Bildung und Fällung von FeS hervorgerufen worden sein. Bei der Verstoffwechselung des Cysteins kommt die Bildung von H₂S nach folgendem Reaktionsschema zustande (Cysteindesulhydrase):



Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde auf L-Cystein-HCl und den Einsatz des 100 l - Fermenters vollständig verzichtet; Zellen wurden in 2 l Schottflaschen regelmäßig nach Bedarf gezogen und geerntet.

2 Reinigung der Komponente D aus *C. symbiosum* und *A. fermentans*

Sowohl für die Komponente D aus *C. symbiosum* als auch aus *A. fermentans* sind reproduzierbare Reinigungsmethoden bekannt (Hans et al, 2001). Diese wurden in der vorliegenden Arbeit übernommen und zum Teil verbessert.

Der erste Schritt der Reinigung war eine Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephrose. Komponente D eluierte zwischen 0,25 und 0,35 M NaCl. Als zweiter Schritt folgte eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie an Phenyl-Sephrose. Dabei eluierte die Dehydratase mit absteigendem Ammoniumsulfat-Gradienten zwischen 0,5 und 0,3 M Salz. Dieser zweite Reinigungsschritt stellte den am wenigsten reproduzierbaren aber auch effektivsten Schritt dar. Je nach Zellcharge veränderte sich das Elutionsverhalten der Dehydratase. Letzte Verunreinigungen wurden durch eine weitere Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sephrose oder Uno-Q entfernt. Das homogene Protein eluierte bei steigendem NaCl-Gradienten bei 0,3 M Salz. In der Regel konnte auf diesen letzten Reinigungsschritt verzichtet werden.

Nach der Phenyl-Sephrose war die Dehydratase zu über 90 % homogen und konnte für Aktivitätsmessungen und Komplexbildung verwendet werden. Lediglich bei der Molybdänbestimmung wurde der dritte Chromatographieschritt verwendet. Komponente D wurde mit Hilfe von Centrikons (YM 30-Filter) entsalzt und ankonzentriert und bei -80 °C anoxisch gelagert.

Komponente D aus *Clostridium symbiosum*

Reinigungsschritt	Aktivität [U]	Protein [mg]	Spez. Aktivität [U/mg]	Reinigung -fach	Ausbeute [%]
Zellfreier Extrakt	4850	2600	1,8	1	100
DEAE-Sephrose	4050	1150	3,5	1,9	46
Phenyl-Sephrose	1430	30	41	23	12
Q-Sephrose	1380	27	51	28	10

Alternativ konnte die Phenyl-Sephrose-Säule durch eine Blue-Sephrose-Säule ersetzt werden. Diese bindet Protein mit einer ATP-Bindestelle. Die Reinigung konnte hierbei ebenfalls auf zwei Säulen beschränkt werden, allerdings waren die Ausbeuten an homogenem Enzym deutlich geringer.

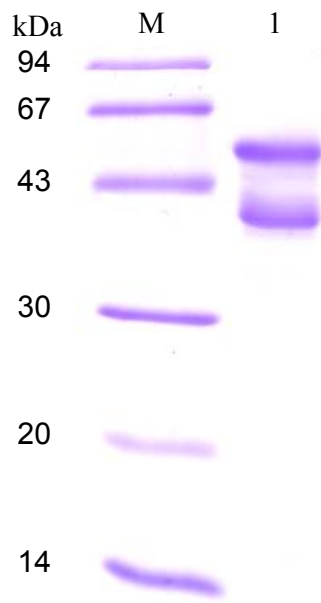


Abb. 9: SDS-PAGE der gereinigten 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase (Komponente D) aus *C. symbiosum*. Das Gel (15 % Acrylamid) wurde mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. M: Marker-Proteine 1: 10 µg gereinigtes Protein

Die Komponente D aus *A. fermentans* wurde nach der beschriebenen Reinigungsmethode (Hans et al., 2000) isoliert. Hierbei wurden ähnliche Mengen an Enzym gereinigt wie aus *C. symbiosum*.

3 Eigenschaften der Komponente D aus *C. symbiosum*

Wie in früheren Arbeiten beschrieben, handelt es sich bei der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* um ein heterodimeres Protein ($\alpha\beta$, 96 kDa), das durch SDS-PAGE und Gelfiltration gezeigt wurde. Erneute chemische Analysen ergaben $8 \pm 0,5$ Nicht-Häm-Eisen pro Dimer sowie $8 \pm 0,5$ säurelabiler Schwefel pro Dimer. Diese Stöchiometrie bestätigt frühere Analysen und weist daher auf zwei [4Fe-4S]Cluster hin. Des weiteren wurde mittels kombinierter UV-vis-Spektroskopie und HPLC-Experimente 1 FMN als prosthetische Gruppe bestätigt. Die Kristallstruktur der beta-Untereinheit der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* zeigt ebenfalls Flavin als prosthetische Gruppe. Allerdings lässt sich in der Struktur nicht erkennen, ob es sich um FMN oder Riboflavin handelt.

3.1 Untersuchungen zum Metallgehalt der Komponente D aus *C. symbiosum*

Frühere Experimente zeigten, dass sich der Redoxzustand der prosthetischen Gruppen in Komponente D bei Zugabe der reduzierten Komponente A und ATP nicht ändert (Hans et al, 2002). Somit musste die Frage gestellt werden, wie das zur Reaktion benötigte Elektron von Komponente A über Komponente D zum Substrat übertragen wird. EPR-Experimente lieferten einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein eines d^1 -Metalles wie Mo(V) oder W(V). Chemische als auch physikalische Analysen gereinigter Komponente D aus *C. symbiosum* und *A. fermentans* ergaben einen Molybdängehalt von 0,1-0,2 Mo per Dimer. Ebenfalls wurde der Molybdängehalt der fraktionierten Enzyme im Verlauf einer Reinigung verfolgt. Hierbei konnte eine Koelution der Aktivität, der Komponente D und des Molybdängehaltes beobachtet werden.

Wie in Abb. 10 ABC zu sehen ist, scheint die Koelution erst bei der letzten Säule leicht zu divergieren. Diese Beobachtungen werden auch bei der 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium difficile* gemacht, wobei im Verlauf der dritten Säule das Molybdän vollständig abgetrennt wird (identisches Reinigungsprotokoll) (Kim et al, unveröffentlicht).

Die Reinheitsüberprüfung mittels SDS-PAGE weist nur schwache Verunreinigungen im niedermolekularen Bereich auf. Es kann eine Proteinverunreinigung von nahezu gleicher Größe wie die 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase diskutiert werden.

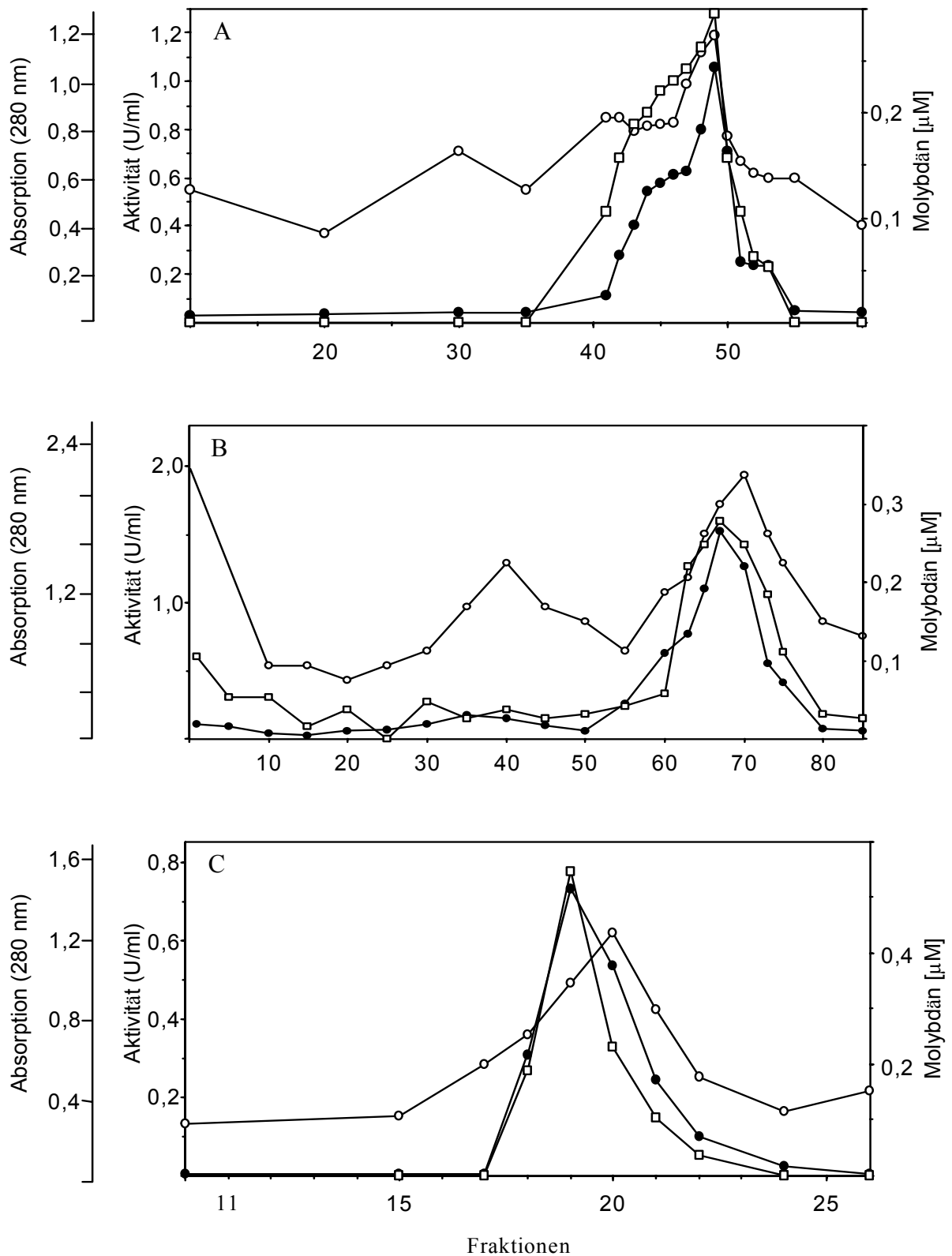


Abb. 10: A: Elutionsprofil der 1. Säule DEAE-Sepharose; B: Elutionsprofil 2. Säule Blue-Sepharose; C: Elutionsprofil 3. Säule Uno Q-Sepharose. Dargestellt sind Volumenaktivität (•), Absorption bei 280 nm (○) und Molybdängehalt (\square).

Da die chemische Bestimmung von Molybdän sehr arbeits- und zeitintensiv ist, wurden sämtliche in Abb. 10 dargestellten Bestimmungen mittels AAS durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine schnell durchführbare und sehr sensitive Bestimmung (Standardbereich bis 500 pg Mo). Zur Absicherung der gemessenen Konzentrationen wurden noch zwei weitere Bestimmungen von unabhängigen Laboratorien durchgeführt.

Im Spurenanalytischen Laboratorium Dr. Baumann (Maxhütte-Haidhof) konnte mit Hilfe von ICP-MS (Plasma - Massenspektrometrie) ein Molybdängehalt von 0,07 Mo per Heterodimer festgestellt werden. Darüber hinaus wurden Zn (3,5 mol), Ni (0,09 mol), Cu (0,173 mol) und Fe (2,5 mol) in quantitativen Mengen bestimmt. Hierbei ist auffällig, dass der „interne“ Referenzwert für Eisen sehr niedrig bestimmt wurde. Am Hahn-Meitner-Institut (Berlin) wurde im BER II-Reaktor mit Hilfe von Neutronen - Aktivierungs - Analyse ein Molybdängehalt von 0,2 mol Mo per Heterodimer bestimmt. Anhand dieser Bestimmungen und qualitativen Unterschiede der Enzymchargen kann man von einem Molybdängehalt der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase von ungefähr 0,1 mol per mol Enzym sprechen.

3.2 Isolierung und erste Untersuchungen eines putativen Kofaktors der Komponente D aus *C. symbiosum*

Aufgrund des Vorhandenseins von Molybdän in der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wurde im weiteren Verlauf versucht, einen potentiellen Kofaktor zu isolieren. Hierbei wurden drei Methoden zur Pterin-Isolation verwendet (siehe Material und Methoden) (Gladyshev & Lecchi, 1995/96; Laukel et al, 2003; Meckenstock et al, 1999). Abbildung 11 zeigt das gefundene HPLC-Profil nach einer Molybdopterininisolierung nach Gladyshev & Lecchi, wobei ein Elutionspeak nach 12,5 min erscheint. Diese Retentionszeit unterscheidet sich von der in der Literatur beschriebenen Zeit für einen Molybdopterine-Kofaktor. Bereits 1992 konnte Anne-Grit Klees bei Untersuchungen zur 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Fusobacterium nucleatum* eine ähnliche Beobachtung machen, nähere Identifikationen schlugen allerdings fehl (Klees, 1992). Um Verunreinigungen in den eingesetzten Chemikalien

auszuschließen, wurde diese der gleichen Methode zur Pterin-Isolation unterzogen und mittels HPLC analysiert.

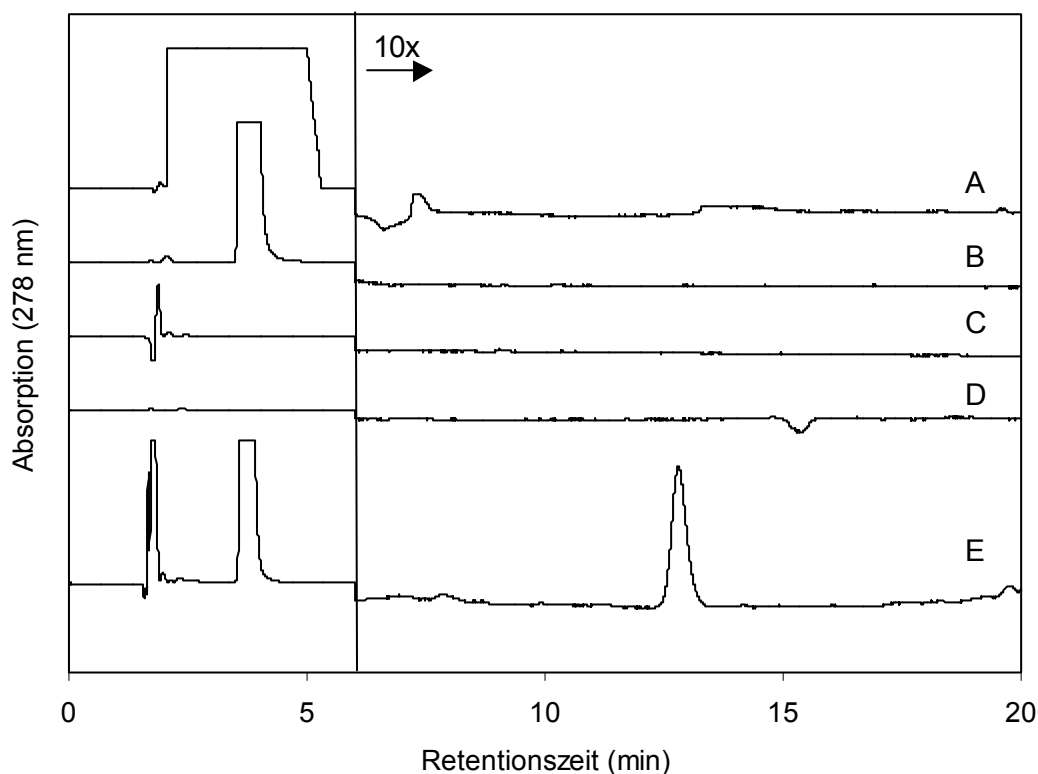


Abb. 11: Elutionsprofil nach „Pterin-Extraktion“ aus Komponente D nach Gladyshev und Lecchi. Als Elutionspuffer diente 50 mM Ammoniumacetat, pH 6,8 + 3 % Methanol. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Als Säule diente eine RP 18 (5 μ m) LiChrospher®100. A: Kontrollexperiment mit Natriumborhydrid; B: Kontrollexperiment mit Iodacetamid; C: Kontrollexperiment mit Guanidiniumchlorid; D: Kontrollexperiment mit FMN; E: „Kofaktor“ der 2-Hydroxyglutaryl-CoA Dehydratase

Der mit dieser Methode gereinigte „Kofaktor“ wurde anschließend vereinigt, ankonzentriert und für weitere Untersuchungen verwendet. Größenbestimmung mittels Maldi-TOF MS und ESI-MS erbrachten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Es konnte lediglich das Vorhandensein eines Molybdopterin-Kofaktors ausgeschlossen werden.

Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, das Molybdopterin-Kofaktoren ein ausgeprägtes und typisches Fluoreszenzspektrum aufweisen. Im Falle des unbekannten Kofaktors aus Komponente D (Isolation nach Laukel et al. und Meckenstock et al.) unterscheiden sich sowohl das Fluoreszenz- als auch das UV-vis-Spektrum grundlegend vom aus Xanthin Oxidase isoliertem Molybdopterin-Kofaktor (Abb. 12 und Abb. 13).

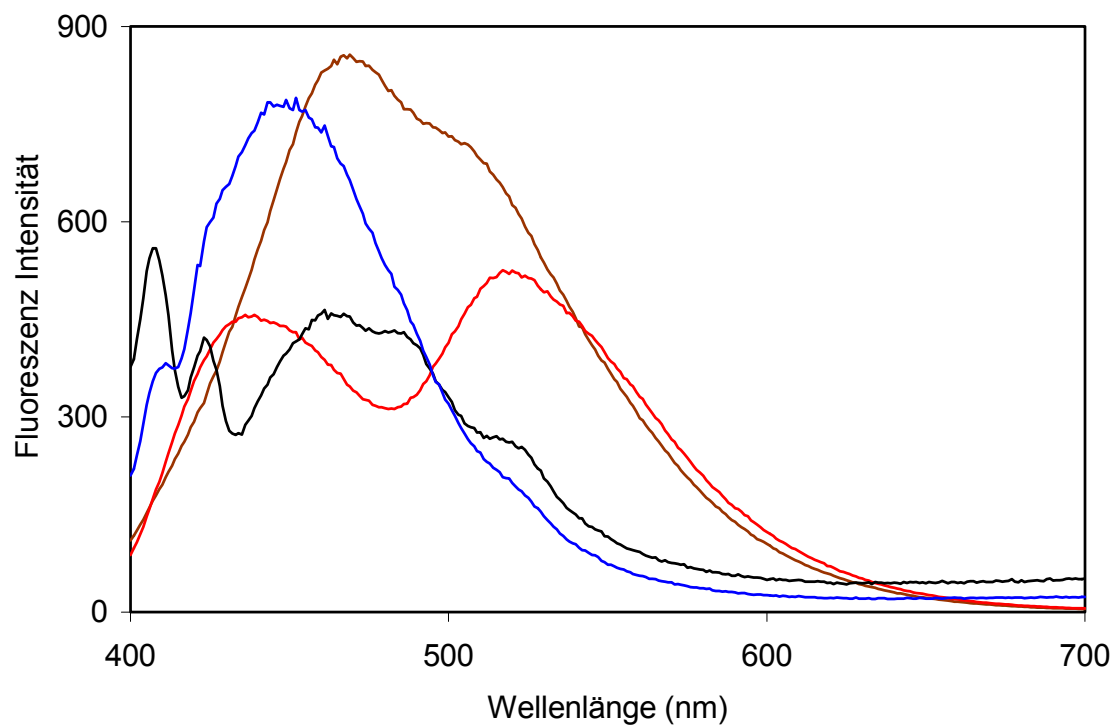


Abb. 12: Emissionsspektrum von Molybdopterin aus Xanthin Oxidase und des Kofaktors aus Komponente D. Als Kontrollen wurden FMN und Pterin-6-carboxylsäure genauso behandelt wie beide Enzyme. Die Anregung erfolgte bei 380 nm. Rot: Dehydratase; Schwarz: FMN; Blau: Pterin-6-carbonsäure; Braun: Xanthin Oxidase

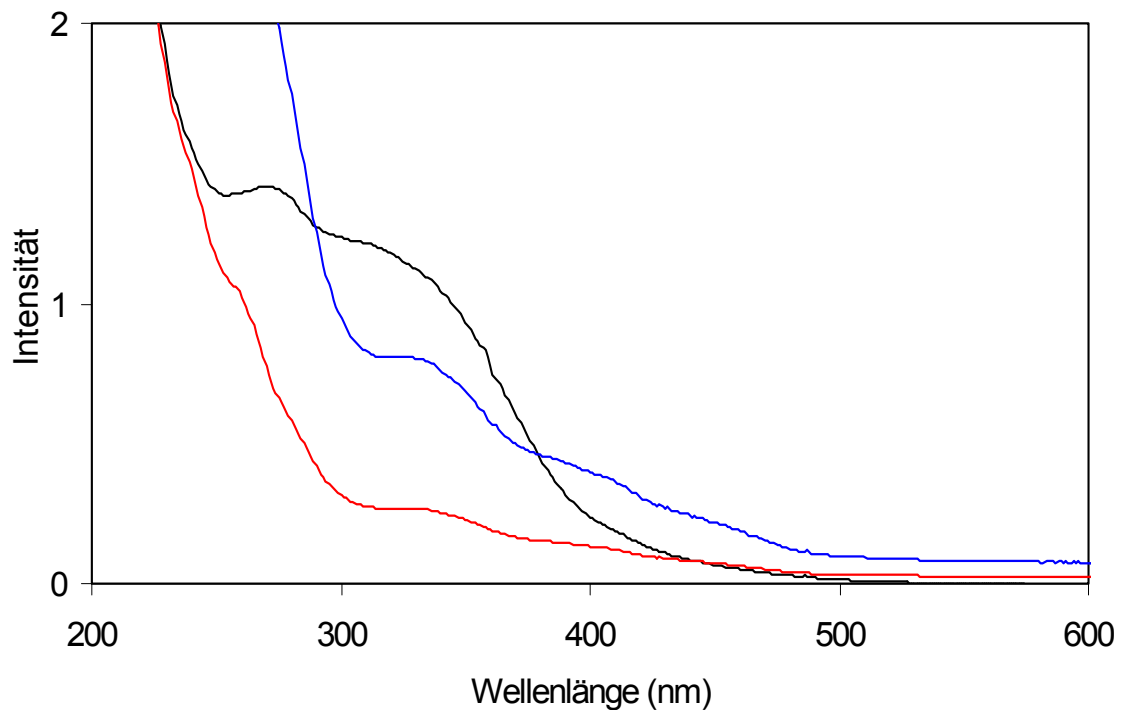


Abb. 13: UV-vis-Spektrum von Molybdopterin aus Xanthin Oxidase und des Kofaktors aus Komponente D. Rot: Dehydratase; Schwarz: Xanthin Oxidase; Blau: Dehydratase 3mal vergrößert

3.3 UV-vis Spektrum des Überstandes von TCA-gefällter Komponente D aus *C. symbiosum*

Mittels UV-vis Spektroskopie können ebenfalls Informationen über vorhandene Kofaktoren, wie z.B. Flavine erhalten werden, da diese charakteristische Spektren unter oxidierten oder reduzierten Bedingungen aufweisen. Dazu wurde Komponente D mit anoxischer TCA denaturiert und unter anoxischen Bedingungen ein Wellenlängenscan des abzentrifugierten Überstandes vorgenommen. Interessanterweise konnte hierbei oxidiertes Flavin detektiert werden.

Eine weitere Beobachtung war das Auftauchen eines bisher nicht detektierten Absorptionsmaximums um 300 und 325 nm. Dieses Signal trat erst nach Inkubation des Überstandes mit Sauerstoff auf und verstärkte sich bei zunehmender Dauer der Inkubation. Ein fast identisches Spektrum konnte auch mit der 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase aus *C. difficile* aufgenommen werden. Bisher konnte nicht geklärt werden, um was es sich bei dieser Absorption handeln könnte.

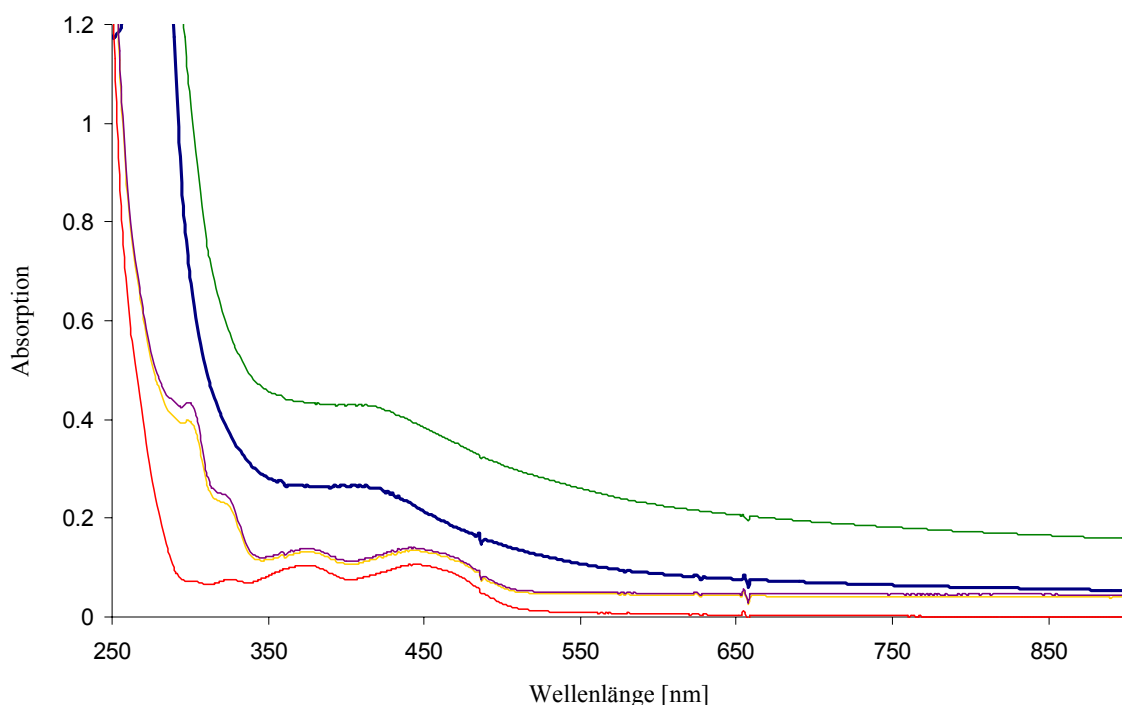


Abb. 14: UV-vis Spektrum des Überstandes von TCA-gefällter 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase. Grün: isolierte Dehydratase; Blau: Dehydratase nach Oxidation an Luft; Rot: Überstand nach TCA-Fällung; Gelb: Überstand nach Oxidation an Luft für 1 min; Indigo: Überstand nach Oxidation an Luft für 2 min

4 Reinigung der rekombinanten Komponente A aus *A. fermentans* mit StrepTactin-Affinitätschromatographie

Wie schon in früheren Arbeiten beschrieben ist die Komponente A, der Aktivator der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase, ein sehr sauerstoffempfindliches Enzym. Es erwies sich außerdem als so instabil, dass eine Reinigung über herkömmliche Chromatographiematerialien nicht möglich war. Mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie kann Komponente A nun durch eine 1-Schritt-Reinigung zur Homogenität isoliert werden. Dabei bindet das rekombinante Protein an das an die Sepharose-Matrix gekoppelte Streptavidin und kann durch Zugabe von 3 mM Desthiobiotin eluiert werden. So konnte aus 1 g Feuchtzellen ca. 1 mg Protein isoliert werden. Die gesamte Reinigungsprozedur erfolgte unter Zusatz von 10 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 5 mM DTT und 2 mM ADP. Unter diesen Bedingungen konnte der Aktivator über den Zeitraum von ca. 10 Tagen stabilisiert werden, ohne nennenswerte Präzipitation des Enzyms. Da für den Aktivitätstest nur geringe Mengen (siehe 5.) an Komponente A benötigt werden, konnte dieser portioniert in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Erst durch mehrmaliges Auftauen kommt es zur Inaktivierung der Komponente A.

5 Optimierung des Aktivitätstests

5.1 Gekoppelter Aktivitätstest

In früheren Experimenten wurde die Aktivität der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase über einen sogenannten gekoppelten Test bestimmt. Da die Reaktion der Komponente D nicht direkt zu bestimmen war, wurden Hilfsenzyme verwendet, welche das bei der Dehydratasereaktion entstehende Glutaconyl-CoA wie im physiologischen Stoffwechselweg weiter zu Acetat oxidieren. Dabei wird die Reaktion der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase als Indikator (Bildung von NADH) genutzt. Im Gegensatz zu beobachteten Ergebnissen konnten mit dieser Methode maximale spezifische Aktivitäten von 3 U/mg gemessen werden, was nur 1/10 der veröffentlichten Werte beträgt. Die Aktivität konnte am Ende auf ca. 10 U/mg gesteigert werden. Unter

diesen Bedingungen lagen alle Komponenten (siehe Material und Methoden) im Überschuss vor. Die Präinkubation betrug jeweils 4 min. Anschließend wurde durch Zugabe von Komponente A die Reaktion gestartet. Hierbei wurde das molare Verhältnis von Komponente D und A variiert. Es konnte beobachtet werden, dass die Endaktivität in allen Fällen immer 10 U/mg erreichte. Allerdings wurde bei Aktivatorüberschuss (Akt:DH 3:1) die maximale Reaktionsgeschwindigkeit schneller erreicht als bei einem Überschuss an Dehydratase (Akt:DH 0,5:1).

Im anderen Fall wurde die Reaktion durch Zugabe von Substrat ((*R*)-2-Hydroxyglutarat) gestartet. Die maximal erreichte Aktivität betrug ebenfalls 10 U/mg. Hierbei wurde ein molares Verhältnis von Komponente A und D von 0,5:1 und 0,1:1 gewählt. Es konnte ebenfalls eine Zeitabhängigkeit festgestellt werden; die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde im ersten Fall nach rund 7 min, im zweiten Fall nach rund 11 min erreicht. Durch die Wahl der Konzentrationsverhältnisse konnte gezeigt werden, dass es sich bei Dehydratasereaktion um einen katalytischen Mechanismus handelt, da auch bei einem molaren Verhältnis von Komponente A und D von 0,1:1 die maximale spezifische Aktivität erreicht wird. Diese Theorie wird im folgenden Absatz deutlicher herausgestellt.

Aktivität der Komponente D im gekoppelten Test

Molares Verhältnis Komp. A zu Komp. D	max. Reaktionsgeschwindigkeit nach [min]	spezifische Aktivität [U/mg]
0,5 : 1	10	8,8 ± 0,2
1 : 1	8	9,7 ± 0,3
1,5 : 1	6 - 7	10,9 ± 0,3
3 : 1	5 - 6	10,9 ± 0,3
0,1 : 1*	11	9,7 ± 0,3
0,5 : 1*	7	10,3 ± 0,2

* Start mit Substratzugabe

5.2 Direkter Aktivitätstest

Die Aktivität der 2-Hydroxyglutaryl-CoA Dehydratase kann auch direkt gemessen werden. Die Umsetzung von (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA zu (*E*)-Glutaconyl-CoA bringt durch die Wasserabspaltung das Einfügen einer Doppelbindung mit sich. Diese Doppelbindungen sind im UV-Bereich von 260 nm detektierbar. Da bei dieser Wellenlänge eine starke Absorption des Adenin zu beobachten ist (ATP im Test), wurden die Aktivitätsmessungen bei 290 nm durchgeführt. Der Vorteil dieser Messung liegt darin, dass keine 6 Hilfsenzyme benötigt werden. Des weiteren kann in diesem Fall gut überprüft werden, ob es sich bei der Dehydratasereaktion um einen katalytischen oder stöchiometrischen Mechanismus handelt, da nur Komponente D und A im Reaktionsgemisch vorliegen. Dafür wurden wiederum verschiedene molare Verhältnisse von Dehydratase zu Aktivator im Enzymtest eingesetzt.

Wird der Aktivitätstest durch Zugabe von Komponente A gestartet, so ist ebenfalls eine Zeitabhängigkeit der Reaktion zu erkennen. Liegt Komponente A im Überschuss vor (Akt:DH 5:1), so ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nach rund 10 sec erreicht. Bei einem Verhältnis von Akt:DH 0,5:1 werden hingegen rund 30 sec zum Erreichen der Maximalgeschwindigkeit benötigt. Die Aktivität ist dabei um den Faktor 2 geringer. Wird die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet, so werden dieselben Aktivitäten gemessen, allerdings ist keine Zeitabhängigkeit zu beobachten.

Aktivität der Komponente D im direkten Test

Molares Verhältnis Komp. A zu Komp. D	max. Reaktionsgeschwindigkeit nach [sec]	spezifische Aktivität [U/mg]
0,5 : 1	30	4,5 ± 0,1
5 : 1	10	8,4 ± 0,1
0,5 : 1*	0	4,2 ± 0,3
1 : 1*	0	6,2 ± 0,1
1,5 : 1*	0	7,4 ± 0,1
2 : 1*	0	8,0 ± 0,1
5 : 1*	0	8,6 ± 0,1

* Start mit Substratzugabe [20 µM]

Die bei diesem direkten Enzymtest beobachteten Aktivitäten zeigten eine nahezu lineare Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Aktivators. Um einen katalytischen Mechanismus zu postulieren, mussten auch bei einem Verhältnis von Akt:DH 0,1:1 die maximale Aktivität bei einem molaren Verhältnis Akt:DH 1:1 erreicht werden. Durch Zugabe von höheren DTT-Konzentrationen (5 mM im Test) und BSA (40 µg im Test) konnte das Dehydratasesystem hinreichend stabilisiert werden. Bei einem molaren Verhältnis von Akt:DH 0,1:1 konnte somit die maximale Aktivität nach rund 30-40 min Präinkubation erreicht werden.

Durch die Verwendung des direkten Enzymtests konnte der K_m -Wert für das Substrat (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA als auch für Glutaconyl-CoA bestimmt werden.

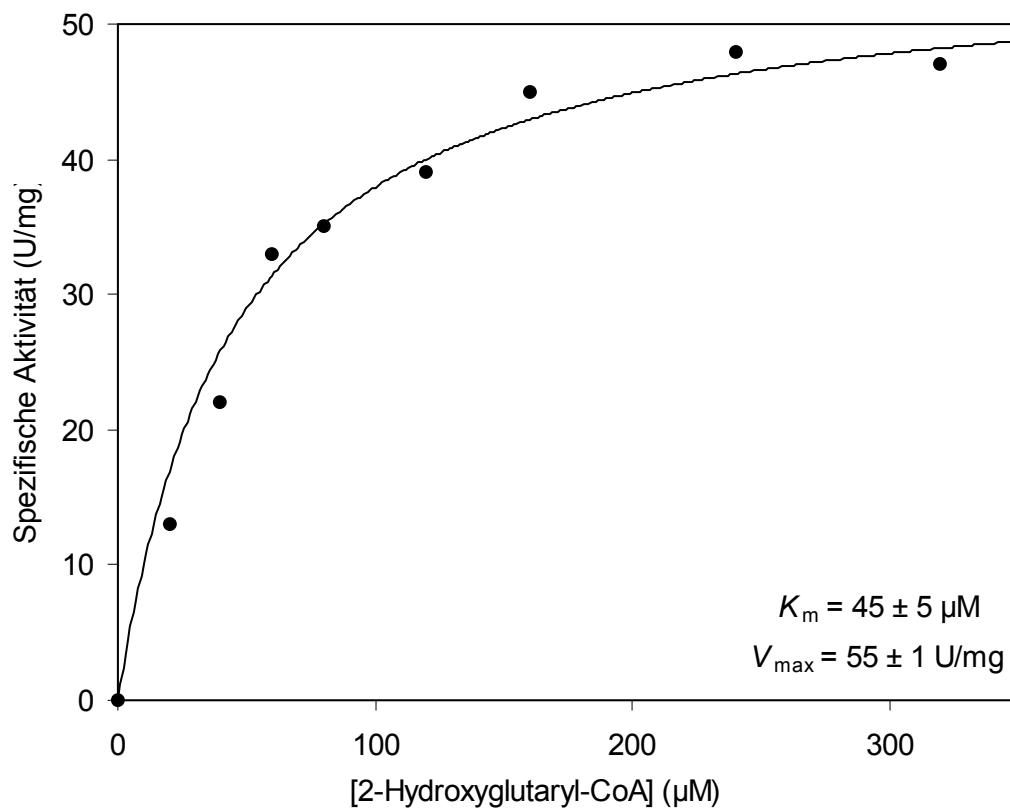


Abb. 15a: Bestimmung des K_m -Wertes für das Substrat (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA der Komponente D.

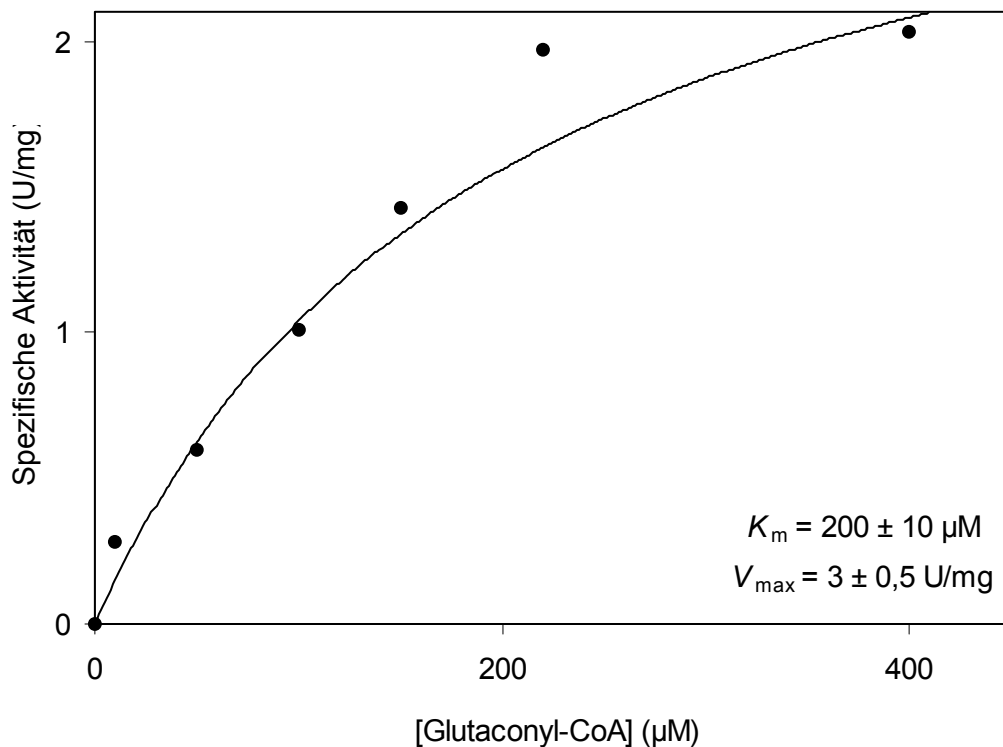


Abb. 15b: Bestimmung des K_m -Wertes für das Substrat (E)-Glutaconyl-CoA der Komponente D.

5.3 Effekt von Metronidazol auf das Dehydratasesystem

Bereits Mitte der 50er Jahre (Ladd & Walker, 1958) konnte gezeigt werden, dass Nitroverbindungen (wie 2,4-Dinitrophenol) die Umsetzung von Laktat zu Acetat und Propionat in zellfreiem Extrakt von *Megasphaera elsdenii* inhibieren (Lactyl-CoA-Dehydratase). In den 90er Jahren wurden Untersuchungen zur Inhibierung der 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen aus verschiedenen Clostridien durch verschiedene Nitroverbindungen im Labor der AG Buckel durchgeführt.

Durch Metronidazol wird auch die 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase schon bei Konzentrationen ab $25 \mu\text{M}$ irreversibel inhibiert. Der hemmende Effekt des Antibiotikums unter $25 \mu\text{M}$ konnte durch Zugabe von Komponente A (molarer Überschuss) und/oder ATP abgemildert werden. Dies wurde sowohl im gekoppelten als auch im direkten Aktivitätstest beobachtet. Weitergehende Untersuchungen wurden nicht durchgeführt (Hemmung der Komponente A, der ATPase-Aktivität der

Komponente A, Hemmung der Komplexbildung). Bisher ist der Wirkungsmechanismus von Metronidazol nicht geklärt. Als mögliche Interpretation der Hemmung kann die Interaktion der Komponente A mit ATP oder aber der Interaktion beider Komponenten zueinander diskutiert werden.

6 ATPase-Aktivität der Komponente A

Durch kombinierte spektroskopische Methoden (UV-vis-, EPR-, Mössbauer-spektroskopie) konnte in früheren Arbeiten ein Elektronenfluss von Komponente A nach Komponente D gezeigt werden. Dabei ist zu beobachten, dass reduzierte Komponente A in Gegenwart von ATP mit Komponente D interagiert, wobei Komponente A oxidiert wird. Im Einklang zur Theorie des ATP-getriebenen Elektronentransfers steht die Beobachtung einer ATPase-Aktivität von Komponente A. Neuere Messungen konnten die bisher veröffentlichten Ergebnisse (Hans et al., 2002) nicht bestätigen. Es hat sich gezeigt, dass Komponente A weder im oxidierten (wie bisher beschrieben) noch im reduzierten Zustand eine signifikante ATPase-Aktivität aufweist. Die Zugabe von Komponente D erhöhte die ATPase-Aktivität um den Faktor 6. Die dabei beobachteten Aktivitäten bewegten sich im mU-Bereich (200 mU/mg) und nicht wie bisher beobachtet bei bis zu 5 U/mg.

Trotz dieser Differenzen ist eine klare ATPase-Aktivität erkennbar, die durch die Zugabe von Komponente D zur Komponente A induziert wird. Diese Beobachtung stützt weiterhin die postulierte ATP-induzierte Elektronenübertragung von Komponente A zu Komponente D.

ATPase-Aktivität der Komponente A

Enzym	spezifische Aktivität [mU/mg]
Komponente A _{oxidiert}	10 ± 1
Komponente A _{reduziert}	30 ± 3
Komponente A _{oxidiert} + Komponente D	110 ± 5
Komponente A _{reduziert} + Komponente D	170 ± 10
Komponente A _{oxidiert} + Komponente D + Substrat	150 ± 10

Komponente A _{reduziert} + Komponente D + Substrat	200 ± 10
Komponente D	30 ± 2

Die bei dieser Messung eingesetzten molaren Verhältnisse beider Komponenten betrug 1:1. Eine Konzentrationserhöhung der Dehydratase führte zu keiner Steigerung der ATPase-Aktivität.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität direkt von der Konzentration des MgCl₂ abhängt. Bei einer Konzentration von unter 1 mM konnte keine Aktivität gemessen werden. Diese steigt durch Zugabe von MgCl₂ an und erreicht ab einer Konzentration von 5 mM ihren Maximalwert.

Die Bestimmung des K_m -Wertes für ATP ergab $0,7 \pm 0,1$ mM. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei der ATPase-Bestimmung zusätzlich zu Komponente A und Komponente D zwei weitere Hilfsenzyme (Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Kinase) eingesetzt werden, so dass keine direkte Messung möglich ist.

7 Darstellung des Aluminiumtetrafluorid-induzierten Komplexes aus Komponente D und Komponente A

Wie in vorangegangenen Abschnitten schon beschrieben, kann eine funktionelle Ähnlichkeit des Dehydratasesystems mit dem der Nitrogenase diskutiert werden. In diesem bekannten Beispiel überträgt das Fe-Protein die zur Reaktion benötigten Elektronen und kann somit als funktionelles Äquivalent zur Komponente A des Dehydratasesystems betrachtet werden.

Daher erschien der Versuch einer Komplexbildung – wie bei der Nitrogenase beschrieben – naheliegend (Duyvis et al., 1996; Renner & Howard, 1996; Schindelin et al., 1997). Dafür wurden äquimolare Mengen an Komponente D und Komponente A mit 1 mM AlF₃ und 10 mM KF und ATP (s. 2.20 Material und Methoden) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mittels Gelfiltration analysiert. Die beobachteten Läufe der Gelfiltrations-Chromatographie sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

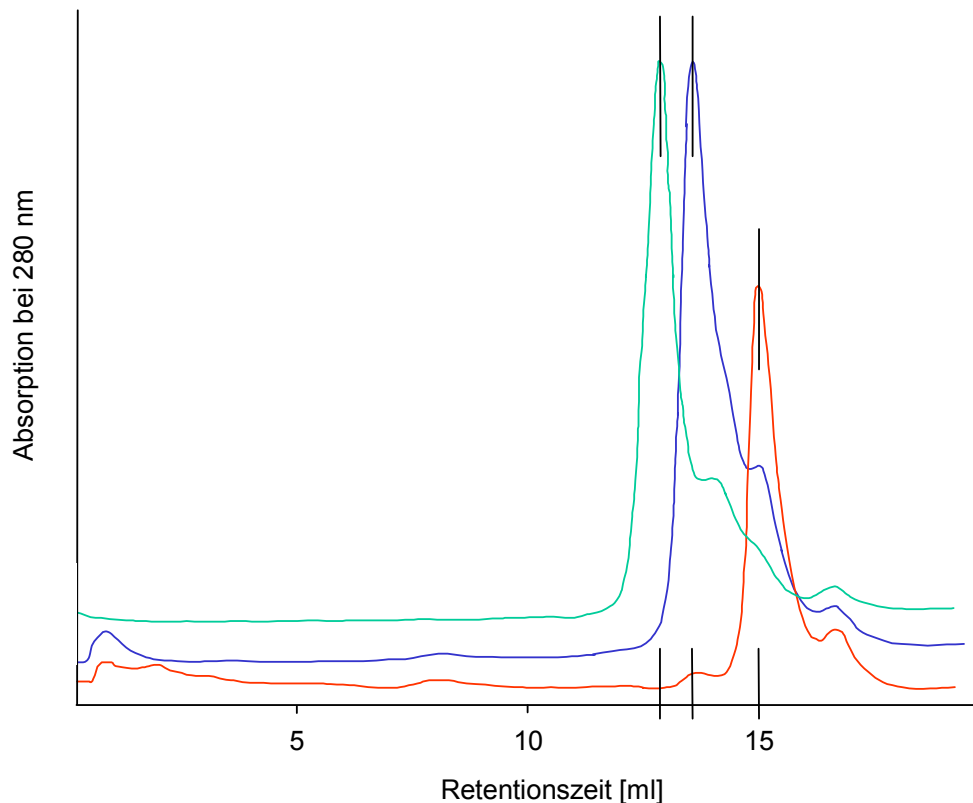


Abb. 16: Chromatographie des AlF_4^- -induzierten Komplexes von Komponente D und A (—), Komponente A (—) und Komponente D und A ohne AlF_3/KF (—) als Kontrolle. Als Säule diente eine Superdex 200 HR 30/10, die mit 20 mM Mops, pH 7,0 + 100 mM KCl bei einer Flussrate von 0,3 ml/min betrieben wurde.

Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, ist es möglich, sowohl den Komplex aus Komponente A und D als auch die jeweiligen einzelnen Komponenten des Dehydratasesystems mittels Gelfiltration zu trennen. Dabei eluierte der Komplex bei 12,9 ml, die native Dehydratase bei 13,8 ml und der Aktivator alleine bei 15,2 ml. Proben der jeweiligen Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 17 zu sehen.

Es wurde ebenso als Kontrollexperiment äquimolare Mengen an Komponente D und Komponente A in Abwesenheit von $\text{AlF}_3 + \text{KF}$ für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mittels Gelfiltration und SDS-PAGE analysiert. Dabei konnte keine Komplexbildung festgestellt werden (nicht dargestellt). Ebenso war keine Komplexbildung in Abwesenheit von ATP, bzw. Ersatz durch ADP zu beobachten.

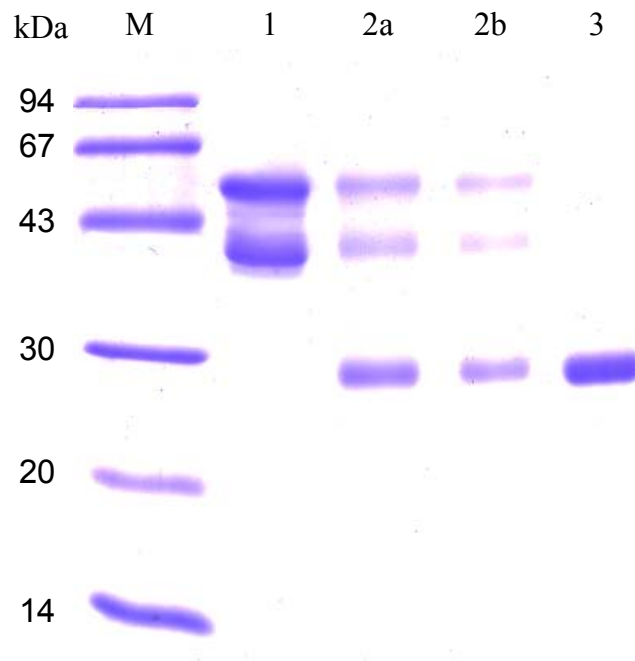


Abb. 17: SDS-PAGE des AlF_4^- -induzierten Komplexes von Komponente D und A aus *Clostridium symbiosum*, sowie Komponente A und Komponente D. Es wurden jeweils 10 μg des Proteins aufgetragen. M: Molekularmassen-Marker; Spur 1: Komponente D; Spur 2a: AlF_4^- -induzierter Komplex von Komponente D und A; Spur 3: Komponente A

Eine weitaus einfachere und effizientere Methode der Aufreinigung des Komplexes konnte durch den Einsatz von Ultrafiltration (YM-100) erzielt werden. Dabei wurde beobachtet, dass nicht komplexierte Komponente D die Membran ebenso passierte wie ungebundene Komponente A.

Durch die Eichung der benutzten Gelfiltration mit Markerproteinen konnte ebenfalls die native Masse der jeweiligen Komponenten des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratasesystems (A und D) als auch die Masse des AlF_4^- -induzierten Komplexes bestimmt werden.

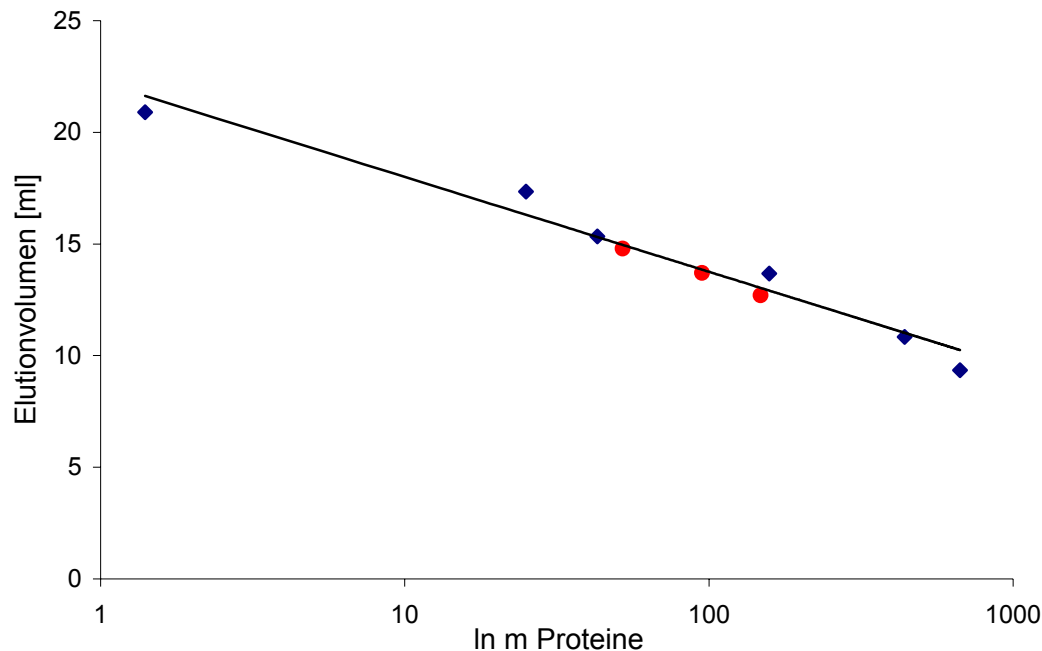


Abb. 18: Gelfiltration bzw. Kalkulation der nativen Massen des AlF_4^- -induzierten Komplexes sowie Komponente A und Komponente D.

Für den Komplex wurde eine molekulare Masse von 148 kDa bestimmt. Dies entspricht der theoretischen Masse von 150 kDa. Für Komponente D wurde eine Masse von 95 kDa, für Komponente A von 52 kDa bestimmt.

8 Aktivitätsmessungen des Aluminiumtetrafluorid-induzierten Komplexes

Die Bestimmung der Dehydratase-Aktivität des Komplexes wurde mit Hilfe des direkten Aktivitätstests durchgeführt. Dabei wurde dem Ansatz $\text{AlF}_3 + \text{KF}$ (s. 2.20 Material und Methoden) zugegeben, die Inkubationszeit variiert und anschließend die Aktivität gemessen. Es wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust durch Inkubation mit $\text{AlF}_3 + \text{KF}$ gemessen (siehe Abb. 18). Um sicher zu stellen, dass tatsächlich eine Komplexbildung stattgefunden hat, wurde eine gleichbehandelte Probe mittels Gelfiltration positiv analysiert. Interessanterweise zeigte der so gereinigte Komplex keine Dehydratase-Aktivität.

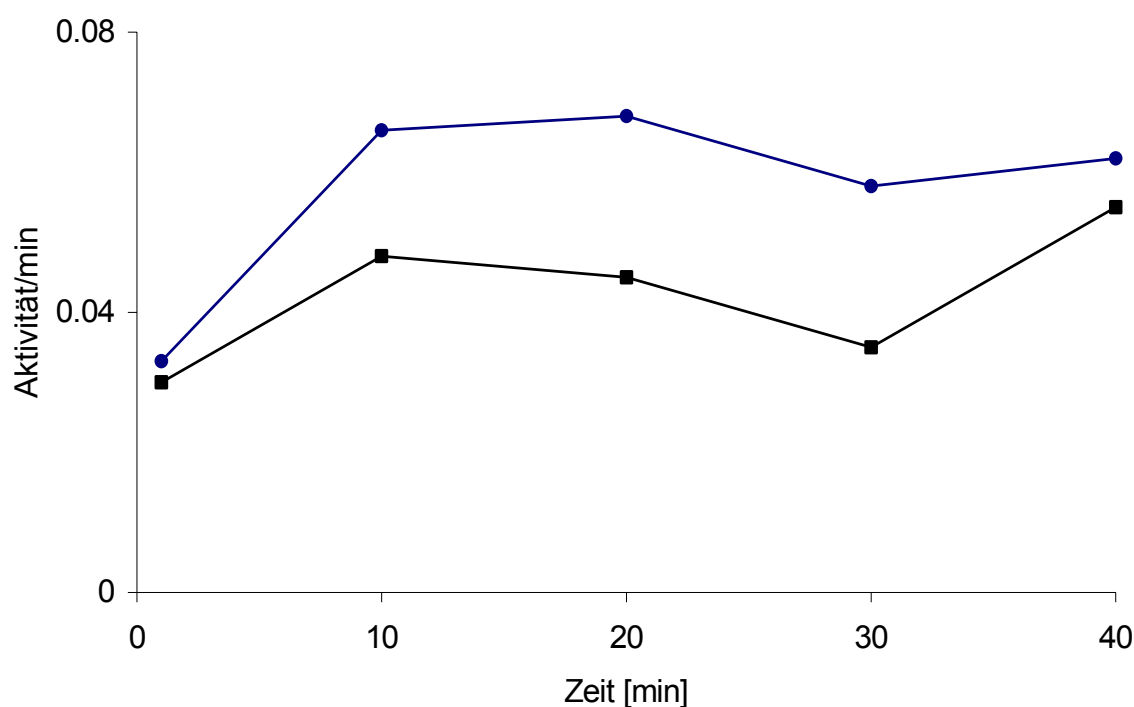


Abb. 19: Standardaktivitätstest mit Zugabe von 10 mM KF und 1 mM AlF₃ (■) sowie ohne Zugabe als Kontrollmessung (●).

9 EPR-Messungen mit Komponente D, Komponente A und Aluminiumtetrafluorid-induziertem Komplex

Ein wesentlicher Aspekt der vorgenommenen EPR-Messungen sollte in der Reproduktion der bisher als d^1 -Metallsignal interpretierten Spektren (aus *A. fermentans*) als auch in der Observierung einer Radikalspezies liegen. Beide Punkte wurden im Fall der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* nicht bestätigt werden. Die gefundenen Signale weisen keine Ähnlichkeiten mit bisher veröffentlichten Eisen-Schwefel-Spezies auf.

Die sogenannten „Low-Field“ EPR-Spektren (high spin) der Komponente A weisen typische $S = 3/2$ Signale zwischen 100 und 300 mT auf, welche sich durch Zugabe von Komponente D, ATP/ADP und Substrat verändern (Abb. 20).

„High-Field“ EPR-Signale (low spin) werden den Eisen-Schwefel-Zentren der Komponente D zugeordnet. Äquimolare Mengen von Komponente A und D in Gegenwart von ATP zeigen keine Veränderungen der Redoxzustände der bekannten Kofaktoren. Allerdings verändert sich ein Signal mit einem g -Wert von 2,016 sowohl in

Form als auch in Intensität. Diese Veränderungen (2 mal stärkere Intensität) werden durch Zugabe des Substrates noch verstärkt (Abb. 22).

Im Fall der 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium difficile* sind die erhaltenen EPR-Signale eindeutiger. Zum ersten Mal konnte ein Signal eines organischen Radikals mit einem g -Wert von 2,002 und spezifischen „Hyperfine Kopplungen“ zweier Protonen detektiert werden (mit freundlicher Genehmigung von Jihoe Kim) und somit den postulierten Radikalmechanismus erhärten (Abb. 21).

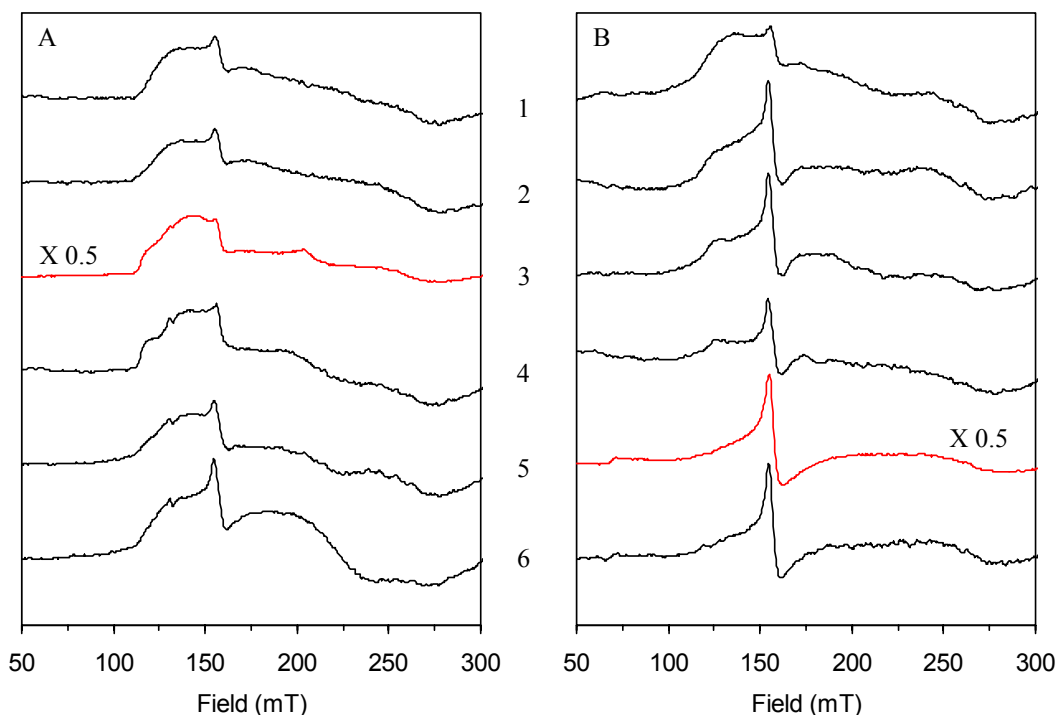


Abb. 20: High-Spin EPR-Signale von 2-Hydroxyacyl-CoA Dehydratasen. Konzentrationen: Aktivator/Dehydratase 50 μ M, ATP/ADP 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Substrat 0,1 mM. EPR-Bedingungen: Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsfrequenz, 100 kHz; Temperatur, 10 K; Modulationsamplitude, 1,25 mT; Mikrowellenenergie, 0,1 mW.

A: 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase; B: 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase.

1: Aktivator; 2: Aktivator + Dehydratase + ADP; 3: Aktivator + Dehydratase + ATP; 4: AlF_4 -induzierter Komplex + ATP; 5: AlF_4 -induzierter Komplex + ATP + Substrat; 6: Aktivator + Dehydratase + ATP + Substrat

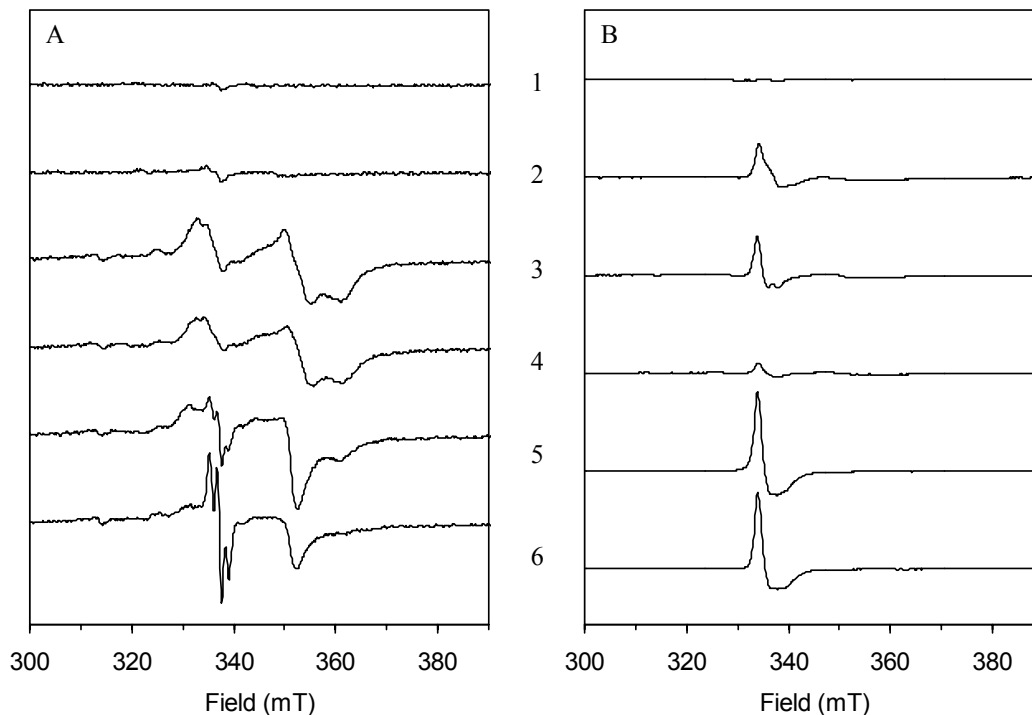


Abb. 21: Low-Spin EPR-Signale von 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen. Konzentrationen: Aktivator/Dehydratase 50 μ M, ATP/ADP 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Substrat 0,1 mM. EPR-Bedingungen: Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsfrequenz, 100 kHz; Temperatur, 10 K; Modulationsamplitude, 1,25 mT; Mikrowellenenergie, 20 mW.

A: 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase; B: 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase $\times 0,1$.

1: Aktivator; 2: Aktivator + Dehydratase + ADP; 3: Aktivator + Dehydratase + ATP; 4: AlF_4 -induzierter Komplex + ATP; 5: AlF_4 -induzierter Komplex + ATP + Substrat; 6: Aktivator + Dehydratase + ATP + Substrat

Die schon erwähnten Besonderheiten der EPR-Spektren der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase werden im Folgenden (Abb. 22ABC) noch einmal deutlicher dargestellt. Äquimolare Mengen von Komponente A und D (+ ADP) zeigen ein Signal bei $g = 2,0235$ mit einer „Schulter“ bei $g = 2,016$ (Abb. 22A). Die Zugabe von ATP verstärkt das Signal bei $g = 2,0235$ um das Zweifache, wobei die „Schulter“ bei $g = 2,016$ verschwindet. Des weiteren erfährt das Signal $g = 1,930$ eine Verstärkung und ein neues Signal bei $g = 2,005$ erscheint (Abb. 22B). Diese beiden neuen Signale verschwinden durch Zugabe von Substrat (Abb. 22C).

EPR-Messungen der L-Serin-Dehydratase aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Hofmeister et al., 1994) lieferten ähnliche Signale und wurden als $[3Fe-4S]^+$ Cluster diskutiert (siehe Diskussion).

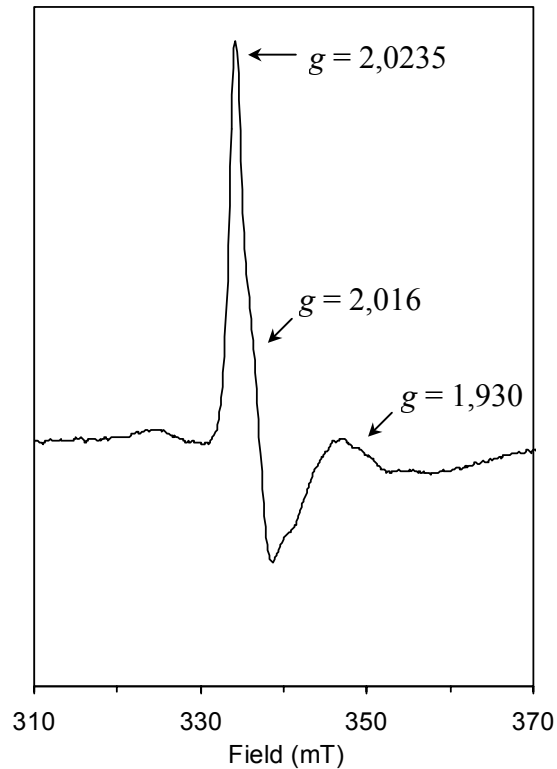


Abb. 22A: Low-Spin EPR-Signal der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase + Aktivator + ADP. Konzentrationen: Aktivator/Dehydratase 50 μ M, ADP 10 mM, MgCl_2 5 mM. EPR-Bedingungen: Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsfrequenz, 100 kHz; Temperatur, 10 K; Modulationsamplitude, 1,25 mT; Mikrowellenenergie, 20 mW.

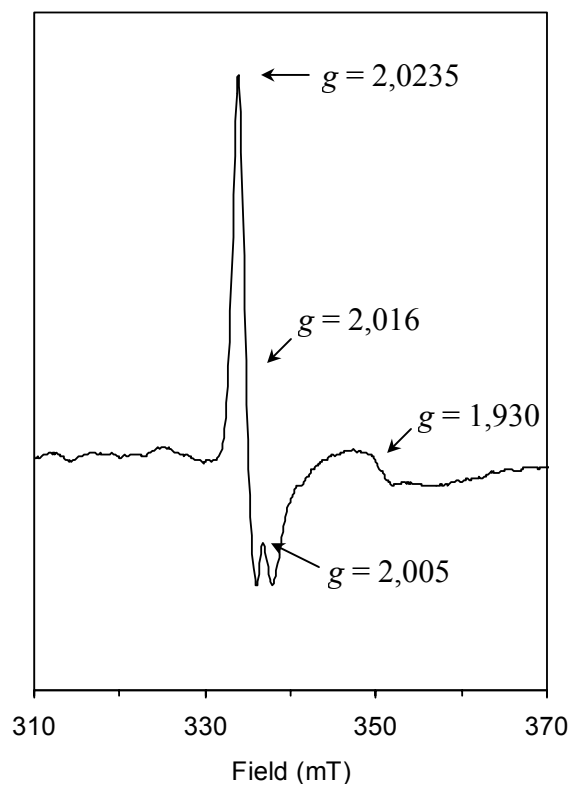


Abb. 22B: Low-Spin EPR-Signal der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase + Aktivator + ATP. Konzentrationen: Aktivator/Dehydratase 50 μ M, ADP 10 mM, MgCl_2 5 mM. EPR-

Bedingungen: Mikrowellenfrequenz, 9.458 GHz; Modulationsfrequenz, 100 kHz; Temperatur, 10 K; Modulationsamplitude, 1.25 mT; Mikrowellenenergie, 20 mW.

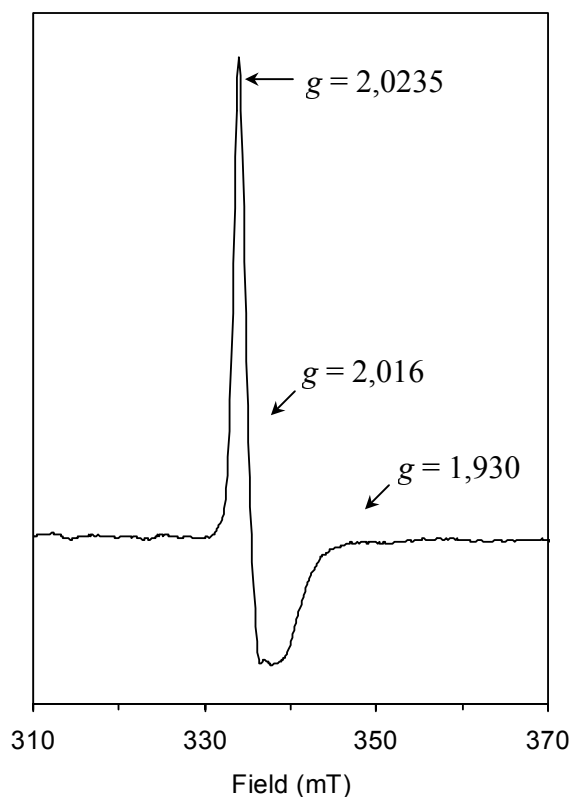


Abb. 22C: Low-Spin EPR-Signal der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase + Aktivator + ATP + Substrat. Konzentrationen: Aktivator/Dehydratase 50 μ M, ADP 10 mM, MgCl_2 5 mM. EPR-Bedingungen: Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsfrequenz, 100 kHz; Temperatur, 10 K; Modulationsamplitude, 1,25 mT; Mikrowellenenergie, 20 mW.

10 Kristallisation des Aluminiumtetrafluorid-induzierten Komplexes aus Komponente D und Komponente A

Im Rahmen eines „Forschungsaufenthaltes“ im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung von Prof. Huber, Arbeitsgruppe Dr. Albrecht Messerschmidt konnten Kristalle des AlF_4^- -induzierten Komplexes der Komponente D und A gezüchtet werden. Dieser Enzymkomplex kristallisierte innerhalb von 12 h unter anoxischer Atmosphäre bei folgenden Bedingungen:

0,2 M tri-Ammoniumcitrat, 20 % PEG 3350. Die Proteinkonzentration variierte zwischen 7 und 15 mg/ml im Kristallisationsansatz. Eine zu hohe Proteinkonzentration löste ein „explosionsartiges“ Wachstum der Kristalle aus (Igelbildung). Die besten

Ergebnisse, d.h. Single-3D-Kristalle wurden bei einer Konzentration von 7 mg/ml beobachtet. Allerdings benötigten die Kristalle unter diesen Bedingungen 36 bis 48 h zur maximalen Reifung und erreichten eine Größe von ca. $250\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$.



Abb. 23: Kristalle des AlF_4^- -induzierten Komplexes

Erste Messungen der Diffraktion erfolgten im Laboratorium für Strukturforschung in Martinsried und erzielten eine Streuung bis zu einer Auflösung von 4-6 Ångström.

11 Kristallisation und Struktur der beta-Untereinheit der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Während des oben genannten Aufenthaltes im Max-Plank-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung von Prof. Huber konnten ebenfalls Kristalle der Komponente D gezüchtet werden. Frühere Kristallisationsansätze der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wurden von Dr. Berta Martins durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuche konnte bereits die 3D-Struktur der β -Untereinheit gelöst werden. Komponente D (bzw. die β -Untereinheit) kristallisierte innerhalb von 2 Wochen unter folgenden Bedingungen:

0,2 M Ammoniumfluorid, pH 6,2, 20 % PEG 3350. Die Proteinkonzentration variierte zwischen 30 und 70 mg/ml im Kristallisationsansatz. Die besten Ergebnisse, d.h. Single-3D-Kristalle wurden bei einer Konzentration von 40 mg/ml beobachtet und erreichten eine Größe von ca. $400\text{ }\mu\text{m} \times 300\text{ }\mu\text{m} \times 150\text{ }\mu\text{m}$.

Diese Kristalle wurden unter anoxischen Bedingungen in ein Transport-Vial überführt und mit einem $200\text{ }\mu\text{m}$ -Loop in flüssigem Stickstoff eingefroren (Oxford System,

Großbritannien). Die Messungen der Diffraktion erfolgten im Laboratorium für Strukturforschung, Martinsried an einem „Image Plate Detector“ (MARResearch, Deutschland) welcher mit einem rotierenden Röntgenstrahl-Generator (Cu-K- α Strahler, Rigaku, Japan) gekoppelt ist. Durch Drehung der Kristalle in 2° -Schritten wurden komplette Datensätze für einen Bereich von 180° aufgenommen. Die Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von 2,6 Ångstrom. Mit Hilfe der MAD-Technik konnte das Phasen-Problem und anschließend die Struktur der beta-Untereinheit der Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase durch Dr. Holger Dobbek, Universität Bayreuth, und Dr. Berta Martins, Martinsried, gelöst werden.

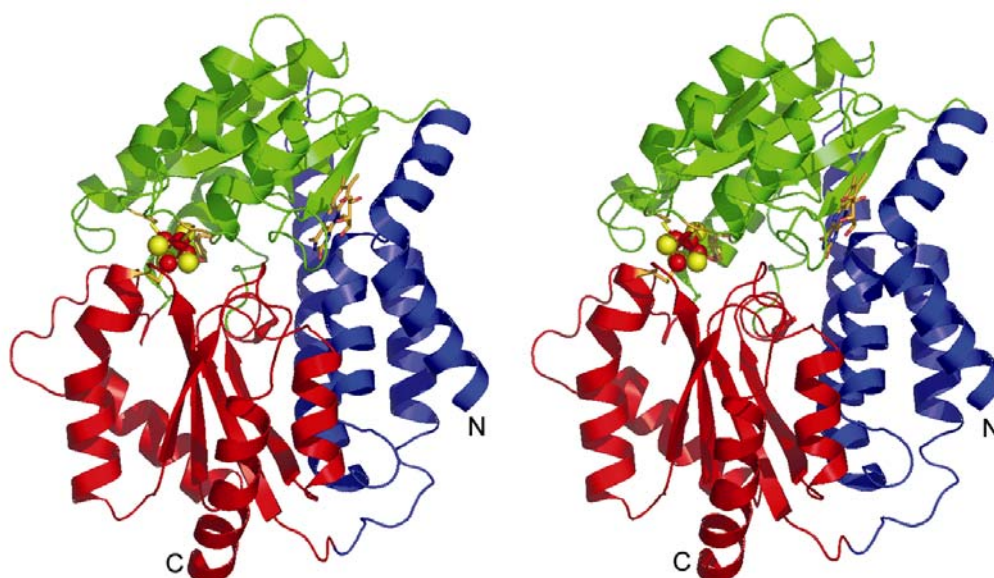


Abb. 24: Stereo-Anblick der Kristallstruktur der beta-Untereinheit der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium symbiosum*. Der [4Fe-4S]Cluster ist durch gelbe (S) und rote (Fe) Kugeln dargestellt.

Die Kristalle gehören zu einem hexagonalen Kristallsystem (Raumgruppe $P3_121$; $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$). Die Faltung der β -Untereinheit wird durch α -Helices dominiert und kann in 3 Domänen unterteilt werden (s. Abb. 24)

In der Kristallstruktur lässt sich ein ungewöhnlicher [4Fe-4S]Cluster erkennen, der durch 3 Cysteine (Cys 74, 101 und 332) und 1 Tyrosin (Tyr 37) koordiniert ist. An dieser Koordination sind die drei strikt konservierten Cys-Reste der HgdB-Sequenz beteiligt. Der Tyr-Rest ist hingegen nicht konserviert. Dieser Cluster sitzt an der Außenseite der Struktur zwischen den zwei Rossmann-Domänen (N- und C-terminale Domänen). Das gebundene Flavin sitzt ebenfalls an der Oberfläche des Monomers,

wobei allerdings durch die zu geringe Elektronendichte ein terminales Phosphat nicht zu erkennen ist. So kann bis jetzt nicht zwischen Riboflavin und FMN unterschieden werden. Die Distanz zwischen dem Flavin und dem [4Fe-4S]Cluster beträgt 15 Ångstrom.

In der beobachteten Gruppierung der Monomere im Kristall erscheinen sechs Moleküle in der gleichen Gestalt und bilden ein putatives Dimer, wobei die zwei [4Fe-4S]Cluster 23 Ångstrom voneinander entfernt sind (Abb. 25 und 26). Ob dieser Dimer eine physiologische Bedeutung hat, muss noch weiter untersucht werden.

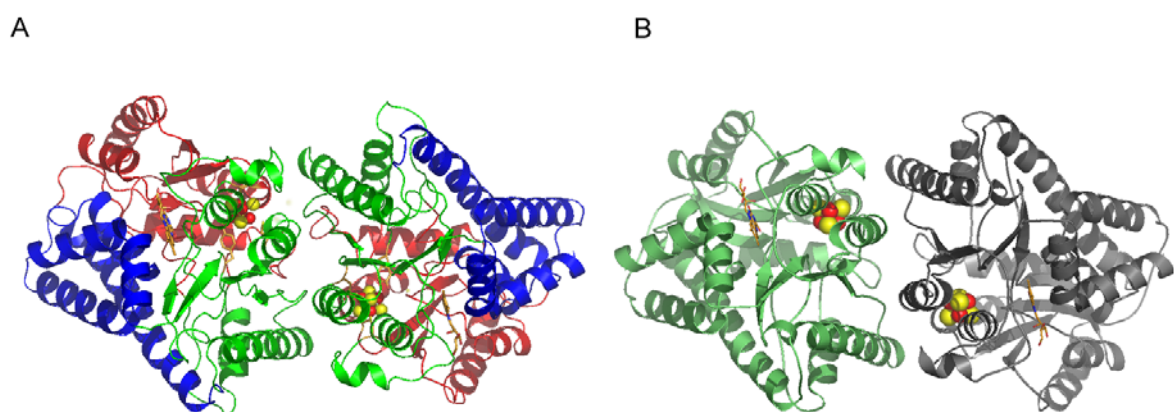


Abb. 25: Stereo-Anblick der Kristallstruktur des putativen Homodimers der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium symbiosum*. Der [4Fe-4S]Cluster ist durch gelbe (S) und rote (Fe) Kugeln dargestellt. A: Die zwei Monomere sind gemäß ihrer Domänen koloriert. B: Jedes Monomer ist individuell koloriert.

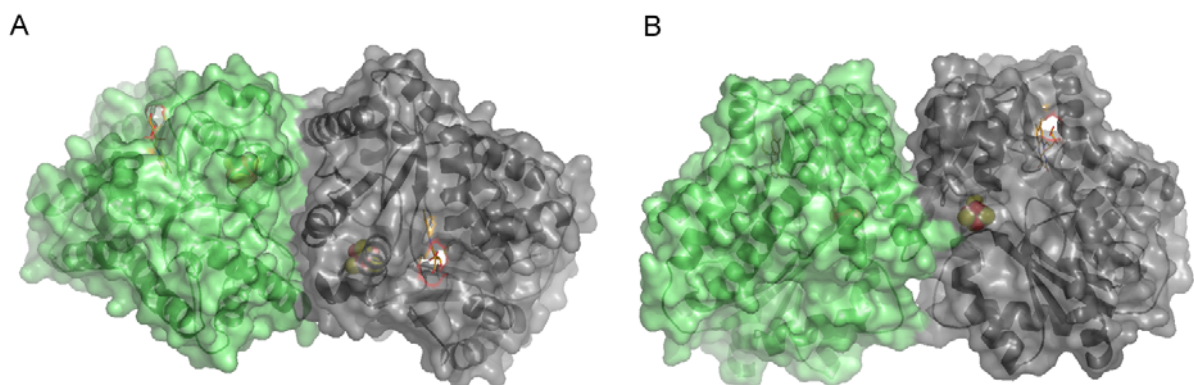


Abb. 26: Stereo-Anblick der Oberfläche der Kristallstruktur des putativen Homodimers der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium symbiosum*. Der [4Fe-4S]Cluster ist durch gelbe (S) und rote (Fe) Kugeln dargestellt. A: Jedes Monomer ist individuell koloriert. B: Durch Drehung von 90° um die horizontale Achse zeigt sich, dass die Verbindung des Dimers nicht sehr komplex ist.

Diskussion

Das 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-System stellt das am intensivsten charakterisierte Enzymsystem der Arbeitsgruppe von Hr. Prof. W. Buckel dar. Die 2-Hydroxyglutaryl-CoA Dehydratase findet sich in drei verschiedenen Glutamat fermentierenden Organismen und zeigt trotz hoher Identität einige Unterschiede (Kofaktorengehalt, Zusammensetzung der Untereinheiten, spezifische Aktivitäten).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Dehydratasesysteme stammten ausschließlich von *Acidaminococcus fermentans* und *Clostridium symbiosum*. Die Aufreinigung des Enzyms aus *C. symbiosum* stellte lange Zeit ein Problem dar, da Veränderungen in der Medienzusammensetzung (L-Cystein-HCl als Reduktionsmittel) zu optisch veränderten Zellen und zu einem veränderten Elutionsverhalten der Dehydratase führte. Die Gründe dafür sind nicht klar, allerdings kann ein Wachstum auf Cystein und somit eine Bildung von FeS diskutiert werden. In wie weit dadurch das veränderte Verhalten der Dehydratase erklärbar ist, bleibt zu diskutieren. Durch den Austausch des Cysteins mit Natriumthioglykolat wurde dieses Problem behoben.

Für eine erfolgreiche Reinigung und weitere Charakterisierung der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase stellte die Umsetzung eines neuen Aktivitätstest einen weiteren Fortschritt dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der bisher verwendete gekoppelte Enzymtest nur eingeschränkt auszuwerten ist. Da man bei diesem Test auf sechs Hilfsenzyme angewiesen ist, konnte er bisher nur für indirekte Aktivitätsmessung eingesetzt werden. Die in früheren Arbeiten veröffentlichten spezifischen Aktivitäten wurden nur zum Teil reproduziert. Es wurde gezeigt, dass bei Bedingungen, bei denen alle an der Reaktion beteiligten Komponenten im Überschuss vorlagen, trotz Variation des Substrates nur unzureichende Aktivitätsänderungen beobachtet werden können. Der Einsatz des direkten Aktivitätstests löste dieses Problem. Ein weiterer Vorteil des neuen Aktivitätstest liegt darin, dass durch den Wegfall der sechs Hilfsenzyme die Interaktion von Komponente A und D direkt zu beobachten ist. So wurde durch die Variation der molaren Verhältnisse von Komponente A zu Komponente D gezeigt, dass es sich bei der Dehydratasereaktion um einen katalytischen Mechanismus handelt.

Diese Beobachtungen belegen zum ersten Mal eindeutig einen Teil des postulierten Katalysemechanismus (Buckel, 1996).

Durch die von der Dehydratase katalysierte chemisch schwierige Wasserabspaltung und dem damit verbundenen postulierten Reaktionsmechanismus, stellte die Detektierung bzw. Klärung des Elektronenflusses einen zentralen Aspekt der bisherigen Forschung dar. In deren Verlauf konnte nie eine Änderung der Redoxzustände der in Komponente D enthaltenen Kofaktoren beobachtet werden. Ein erster Hinweis auf einen weiteren bisher unbekannten Kofaktor trat 1985 (Buckel, persönliche Mitteilung) auf. Metallbestimmungen der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* durch G. Schweiger mit der Plasmaemissionsanalyse ergaben einen Gehalt von 1 Molybdän pro 6 Eisen pro Enzym, die aber mit nasschemischen Methoden nicht bestätigt werden konnte. Erst der intensive Einsatz von EPR-Spektroskopie lieferte Ende der 90er Jahre einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Molybdän am Katalysemechanismus. Es wurde ein Signal detektiert, welches erst durch Aktivierung des Systems durch ATP auftrat und bei Zugabe von Substrat verschwand. Dieses Signal konnte einem d^1 -Metall zugeordnet werden und stellt nur rund 20 % der in der Messung beteiligten Komponente D dar. Betrachtet man die ersten Metallanalysen, so korrelieren diese beiden Beobachtungen weitestgehend.

Metallanalysen im Rahmen dieser Arbeit zeigten stets eine Koelution von Molybdän und Enzym sowie Aktivität während einer Reinigung aus *C. symbiosum* (Hans et al., 2002). Weitere Untersuchungen der im Labor bearbeiteten Dehydratasen ergaben einen „Gleichstand“ an Molybdängehalt. Im Falle der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Acidaminococcus fermentans* und *Clostridium symbiosum* sowie der Lactyl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium propionicum* (T. Selmer, persönliche Mitteilung) konnte Molybdän zwischen 0,1 und 0,2 mol per mol Enzym nachgewiesen werden. Im Falle der Phenyllaktat-Dehydratase aus *Clostridium sporogenes* (S. Dickert, persönliche Mitteilung), der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Fusobacterium nucleatum* (A. Tamannaei, Diplomarbeit) und der 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium difficile* (J. Kim, persönliche Mitteilung) wurde kein Molybdän detektiert. Bei den letzten beiden Beispielen wurde gezeigt, dass die Koelution von Molybdän und Enzym im Verlauf einer Aufreinigung im letzten Chromatographieschritt verloren geht.

Diese Beobachtungen standen zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht zur Verfügung. Das Vorhandensein von Molybdän bei drei Dehydratasen hatte eine langwierige Suche nach einem potentiellen molybdänhaltigen Kofaktor zur Folge. In dieser Zeit konnten Hinweise auf einen molybdopterinartigen Kofaktor gefunden werden. Dieser zeigte ein ähnliches Elutionsverhalten bei seiner Aufreinigung mittels HPLC; die detektierten UV-vis- und Fluoreszenzspektren unterschieden sich hingegen grundlegend von allen bekannten Literaturbeispielen. Der Versuch einer Größenbestimmung mittels Maldi-TOF MS und ESI-MS erbrachten keine klaren bzw. reproduzierbaren Ergebnisse.

Durch Behandlung der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase mit TCA für eine Flavinbestimmung im Überstand trat eine weitere bisher nicht näher charakterisierte Beobachtung auf. Im Überstand wurde oxidiertes Flavin detektiert, welches in nativer Komponente D nicht sichtbar ist. Nach Inkubation an Luft erscheint ein neues, bisher unbekanntes UV-vis Spektrum im Bereich von 290 bis 350 nm. Eine detailliertere Identifikation dieses Phänomens wurde bisher nicht durchgeführt.

Die bereits geschilderten biochemischen Ähnlichkeiten zwischen den aktivierenden bzw. elektronenübertragenden Komponenten des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Systems sowie des Nitrogenase-Systems legten den Schluss nahe, dass ein durch AlF_4^- -stabilisierter Komplex zwischen Komponente A und D möglich ist. Durch diese Komplexbildung sollte die postulierte und bereits durch UV-vis- und EPR-Spektroskopie angedeutete Interaktion der Komponenten A und D belegt werden. Tatsächlich konnte ein solcher Komplex gebildet und mittels Gelfiltration, SDS-PAGE und EPR-Spektroskopie analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass dieser Komplex im Gegensatz zu früheren Beobachtungen des Nitrogenasekomplexes (Duyvis et al., 1996; Renner & Howard, 1996) erheblich stabiler ist (höhere Salzkonzentrationen führten zu keiner signifikanten Destabilisierung). Probleme mit Dissoziation beider Komponenten ergaben sich nur bei Reinigung des Komplexes mittels StrepTactin-Chromatographie. Nach Bildung des Komplexes kann Komponente A noch immer an das StrepTactin binden. Die Elution mit *D*-Desthiobiotin (3 mM) hatte den Zerfall des Komplexes zur Folge. Ob Desthiobiotin tatsächlich für den Zerfall verantwortlich ist, wurde bisher nicht überprüft und soll im Rahmen der weiterführenden Charakterisierung des Komplexes geklärt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte die Reinigung des

Komplexes durch die erheblich einfachere und schnellere Methode mittels Ultrafiltration durchgeführt werden.

Ein weiterer signifikanter Unterschied des gebildeten 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratasekomplexes zum Nitrogenase-Komplex stellt die Inhibierung der Nitrogenaseaktivität durch AlF_4^- dar. Diese zeit- und konzentrationsabhängige Inhibierung der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wurde nicht beobachtet. Gründe hierfür können in strukturellen Unterschieden der Komplexe liegen. Andererseits kann eine Stabilisierung des durch Komponente A energetisch aktivierten Elektrons diskutiert werden, wobei die Nicht-Inhibierung des Komplexes einen indirekten Hinweis auf die „Rückgewinnung“ des Elektrons bietet.

EPR-Messungen mit gebildetem Komplex aus *C. symbiosum* als auch erneute Kontrollmessungen mit identischen Bedingungen, unter denen die beobachteten Signale früherer Messungen mit Komponente A und D aus *A. fermentans* denen eines d^1 -Metallsignals zugeordnet wurden, konnten diese Interpretation nicht bestätigen. Allerdings zeigten sich im Vergleich der aufgenommenen Spektren der 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase und der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase deutliche Unterschiede. 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase zeigt in Anwesenheit von Komponente A und ATP ein deutliches $S = 1/2$ EPR-Signal des $[\text{4Fe-4S}]^+$, welches bei Zugabe von ADP nicht auftritt. Dieses Signal stellt einen deutlichen Hinweis eines veränderten Redoxzustandes des Eisen-Schwefel-Cluster der Komponente D dar. Im Fall der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wird dieses Signal nicht detektiert. Der signifikanteste Unterschied wird nach Zugabe des jeweiligen Substrates deutlich.

Im Fall der 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase erscheint ein Signal eines organischen Radikals mit einem g -Wert von 2,002 und spezifischer „Hyperfine“-Kopplung zweier Protonen. Somit wurde zum ersten Mal ein direkter Beweis für den postulierten Radikalmechanismus geliefert (Buckel, 1996).

Im Falle der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase fällt das Ergebnis nicht so eindeutig aus. Äquimolare Mengen von Komponente A und D in Gegenwart von ATP zeigen keine Veränderungen der Redoxzustände der bekannten Kofaktoren. Allerdings verändert sich ein Signal mit einem g -Wert von 2,0235 sowohl in Form als auch in Intensität. Diese Veränderungen (2 mal stärkere Intensität) verstärken sich durch Zugabe des Substrates. Eine Identifizierung bzw. Zuordnung zu bekannten EPR-Signalen ist sehr schwierig. Lediglich eine Ähnlichkeit mit Signalen der Lactyl-CoA-

Dehydratase aus *Clostridium propionicum* kann diskutiert werden (Kuchta et al., 1986). In diesem Fall wurde Komponente D der Lactyl-CoA Dehydratase mit $K_3[Fe(CN)_6]$ oxidiert. Das resultierende EPR-Signal weist starke Übereinstimmungen mit dem detektierten Signal von äquimolaren Mengen von Komponente A und D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase auf. Ebenso ist eine Ähnlichkeit mit detektierten EPR-Signalen der L-Serin-Dehydratase aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* vorhanden. Diese wurden als ein Signal eines $[3Fe-4S]^+$ Cluster interpretiert. Im Falle der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase könnte die erfolgreiche Lösung der 3D-Struktur die Frage klären, ob tatsächlich ein $[3Fe-4S]^+$ Cluster und ein $[4Fe-4S]^{2+}$ Cluster im Enzym lokalisiert sind.

Über die Frage, warum im Fall der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase kein Radikalsignal detektierbar ist, kann ebenfalls nur spekuliert werden. Da es sich bei radikalischen Zwischenprodukten um sehr labile Spezies handelt, scheint das System im Falle der 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase eventuell durch die Struktur des Substrates oder die Koordination im Enzym stabiler zu sein. Der Einsatz von deuteriertem Substrat könnte sich bei der Detektierung einer Radikalspezies im Falle der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase in zukünftigen Arbeiten als lohnend erweisen. Bisher konnte mit den eingesetzten Techniken die Frage nach dem Verbleib des Elektrons bei der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase nicht geklärt werden.

Aus diesem Grund erschien die Kristallisation sowohl von Komponente D als auch von AlF_4^- -induziertem Komplex als eine weitere noch verbleibende Möglichkeit, nähere Informationen über Zusammensetzung und Arrangement der Kofaktoren zu erhalten. In beiden Fällen ist auch eine Kristallisation gelungen. Leider konnte bei Aufnahme der ersten Diffraktions-Datensätze des Komplexes nur eine Auflösung von 4-6 Ångstrom erreicht werden. Weitere Arbeiten am Dehydratasesystem werden sich hauptsächlich auf die Lösung der Struktur dieses Komplexes konzentrieren, da dadurch mehrere Fragen geklärt werden können.

Zum einen kann die bereits erwähnte Interaktion der Komponenten A und D näher charakterisiert werden. Komponente A mit ihrem Helix-Cluster-Helix Motiv mit einem Winkel von 105° besitzt eine ähnliche Architektur wie das Fe-Protein der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* mit einem Helix-Cluster-Helix Winkel von 150° (Howard & Rees, 1994). Im Falle der Nitrogenaseinteraktion öffnet sich dieser Winkel auf 180° (Schindelin et al., 1997). Ob es bei der Interaktion der Komponenten A und D

ebenfalls zu dieser Konformationsänderung auf 180° kommt, kann durch die Auflösung der Struktur des Komplexes gelöst werden. Zum anderen können Einblicke in das aktive Zentrum der Komponente A, Lage der Kofaktoren (Eisen-Schwefel-Cluster, Flavine) und Koordination der am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäurereste weitere Hinweise auf den möglichen Katalysemachanismus erbringen.

Die Auflösung der 3D-Struktur der erhaltenen Kristalle der Komponente D zeigten ausschließlich die Struktur der β -Untereinheit. Warum es nur zu einer Kristallisation einer Untereinheit kam, ist nicht bekannt. Analysen des eingesetzten Proteins mittels SDS-PAGE zeigten, dass beide Untereinheiten im Kristallisationsansatz vorlagen. Der Sequenzvergleich von HgdA und HgdB weist auf eine Verwandtschaft der Alpha- und beta-Untereinheit der Komponente D hin. Die Identitäten sind zwar nur schwach, aber immerhin so signifikant, dass sie in der Suche, in der keine Information über HgdA enthalten war, erkannt wurden. Bemerkenswert ist, dass die zwei in den homologen Bereich fallenden, das [4Fe-4S]-Zentrum koordinierenden Cys-Reste konserviert sind. Falls beide Untereinheiten einen gemeinsamen Vorfahren hatten, der in der Form eines Homodimers vorlag, könnte dies die in der Kristallstruktur gefundenen Dimere der beta-Untereinheit erklären und würde andeuten, dass das $\alpha\beta$ -Heterodimer dem β_2 -Homodimer ähnlich ist.

Eine weitere ungewöhnliche Beobachtung ist die Koordination des in der β -Untereinheit lokalisierten [4Fe-4S]Clusters. In diesem Fall sind drei Eisen durch Cysteine koordiniert, während ein Eisen durch einen Aminosäurerest, das Tyrosin 37 koordiniert wird. Dieses Tyrosin kann als „Parkplatz“ des Ketylradikals durch Stabilisierung des [4Fe-4S]Clusters diskutiert werden. Gentechnische Arbeiten mit Mutationsversuchen an diesem Tyrosin werden zur Zeit durchgeführt (L. Schlüter, persönliche Mitteilung).

Abschließend lässt sich der Mechanismus der *syn*-Dehydratisierung von (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA Estern soweit zusammenfassen (Kim et al., 2004):

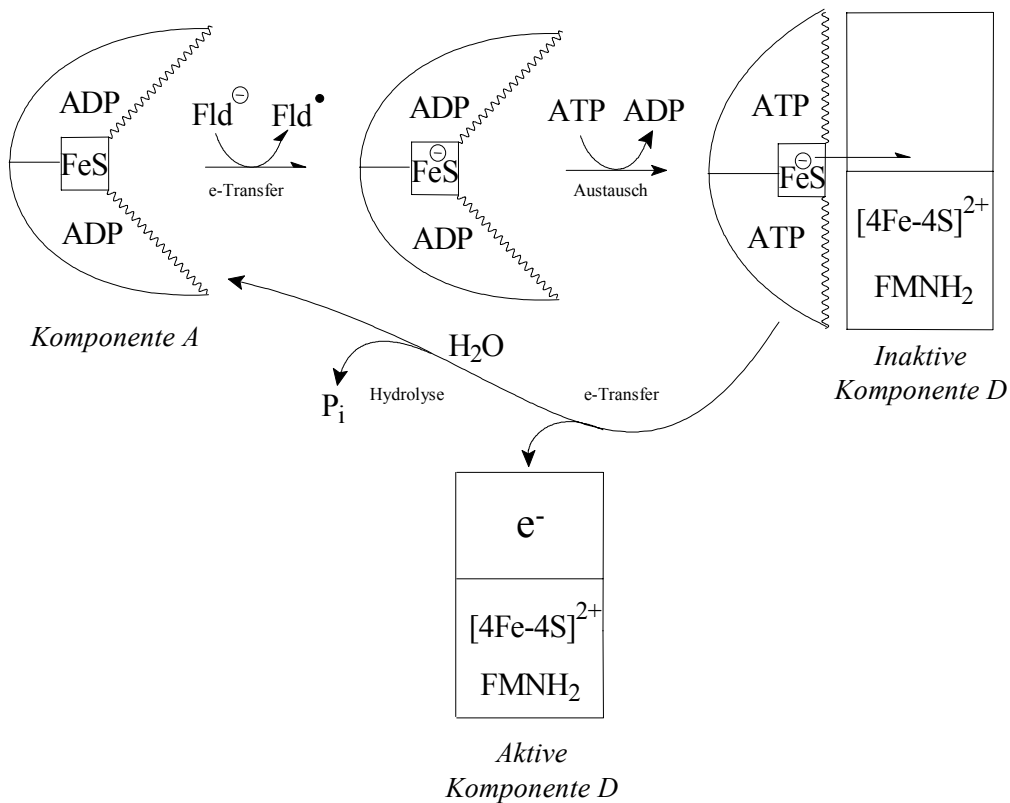


Abb. 24: Postulierter Reaktionsmechanismus der Aktivierung von Komponente D

Im „Ruhezustand“ vorliegende Komponente A weist zwei gebundene ADP pro Untereinheit und einen oxidierten $[4Fe-4S]^{2+}$ -Cluster auf. Der verbrückende $[4Fe-4S]^{2+}$ -Cluster der Komponente A wird durch Ferredoxin oder Flavodoxin durch einen Ein-Elektronen-Transfer reduziert ($[4Fe-4S]^{1+}$). Der Austausch des ADP mit ATP könnte zu einer Konformationsänderung des Helix-Cluster-Helix Motivs (Winkel 105°) führen, mit Öffnung des Helix-Cluster-Helix Winkels auf 180°. Diese Konformationsänderung macht ein „Andocken“ der Komponente A an Komponente D und einen Transfer des Elektrons auf Komponente D möglich. Dieser Schritt ist irreversibel und Komponente A fällt in den Ruhezustand zurück. Das in der Komponente D „geparkte“ Elektron wird bei Zugabe des Substrates auf dieses übertragen; ein Ketylradikal wird gebildet und der postulierte Reaktionsmechanismus (Buckel, 1996) findet statt.

Im Falle der 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase scheint das Elektron über den $[4Fe-4S]^{2+}$ -Cluster der Komponente D zum Substrat zu gelangen. In diesem Fall wurde ein EPR-Signal eines organischen Radikals mit einem g-Wert von 2,002 und

spezifischer „Hyperfine“ Kopplung zweier Protonen detektiert. Somit konnte zum ersten Mal ein direkter Hinweis auf den postulierten Ketylmechanismus erbracht werden.

Im Falle der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase konnte der Verbleib des Elektrons auf Komponente D nicht geklärt werden. Ein EPR-Signal eines organischen Radikals war ebenfalls nicht zu detektieren. Die jüngsten Ergebnisse sprechen nicht mehr für eine Beteiligung von Molybdän am Reaktionsmechanismus. Die Lösung der 3D-Struktur der β -Untereinheit der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase eröffnet eine neue Möglichkeit der Lokalisation des Elektrons. Dieses könnte als Ketylradikal auf einer Aminosäureseitengruppe lokalisiert und durch den [4Fe-4S]Cluster stabilisiert werden. Im vorliegenden Fall sind drei Eisen durch Cysteine koordiniert und ein Eisen durch das Tyrosin 37. Dieses Tyrosin könnte den Schlüssel des postulierten Radikalmechanismus im Falle der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase darstellen.

Literaturverzeichnis

- Barker, H. A., Rooze, V., Suzuki, F. & Iodice, A. A. (1964)** The Glutamate Mutase System. Assays and Properties. *J Biol Chem*, **239**,3260-3266.
- Barker, H. A., Suzuki, F., Iodice, A. & Rooze, V. (1964)** Glutamate Mutase Reaction. *Ann N Y Acad Sci*, **112**,644-654.
- Bartsch, R. G. (1978)** Purification of (4Fe-4S)1-2-ferredoxins (high-potential iron-sulfur proteins) from bacteria. *Methods Enzymol*, **53**,329-340.
- Beinert, H. & Palmer, G. (1965)** Contributions of EPR spectroscopy to our knowledge of oxidative enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **27**,105-198.
- Beinert, H. (1976)** Iron-sulfur proteins, the most numerous and most diversified components of the mitochondrial electron transfer system. *Adv Exp Med Biol*, **74**,137-149.
- Beinert, H. & Thomson, A. J. (1983)** Three-iron clusters in iron-sulfur proteins. *Arch Biochem Biophys*, **222**,333-361.
- Beinert, H. (1985)** Electron-paramagnetic-resonance spectroscopy in biochemistry: past, present and future. *Biochem Soc Trans*, **13**,542-547.
- Beinert, H. (1990)** Recent developments in the field of iron-sulfur proteins. *Faseb J*, **4**,2483-2491.
- Beinert, H. & Kennedy, M. C. (1993)** Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *Faseb J*, **7**,1442-1449.
- Boll, M. & Fuchs, G. (1995)** Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem*, **234**,921-933.
- Boll, M., Albracht, S. S. & Fuchs, G. (1997)** Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. A study of adenosinetriphosphatase activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur J Biochem*, **244**,840-851.
- Boll, M. & Fuchs, G. (1998)** Identification and characterization of the natural electron donor ferredoxin and of FAD as a possible prosthetic group of benzoyl-CoA

-
- reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. *Eur J Biochem*, **251**,946-954.
- Bork, P., Sander, C. & Valencia, A. (1992)** An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**,7290-7294.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**,248-254.
- Breese, K., Boll, M., Alt-Mörbe, J., Schägger, H. & Fuchs, G. (1998)** Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem*, **256**,148-154.
- Breese, K. & Fuchs, G. (1998)** 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*-prosthetic groups, electron donor, and genes of a member of the molybdenum-flavin-iron-sulfur proteins. *Eur J Biochem*, **251**,916-923.
- Buckel, W. & Barker, H. A. (1974)** Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *J Bacteriol*, **117**,1248-1260.
- Buckel, W. & Bobi, A. (1976)** The enzyme complex citramalate lyase from *Clostridium tetanomorphum*. *Eur J Biochem*, **64**,255-262.
- Buckel, W. & Liedtke, H. (1986)** The sodium pump glutacetyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*. Specific cleavage by n-alkanols. *Eur J Biochem*, **156**,251-257.
- Buckel, W. (1996)** Unusual dehydrations in anaerobic bacteria: considering ketyls (radical anions) as reactive intermediates in enzymatic reactions. *FEBS Lett*, **389**,20-24.
- Cammack, R. (1999)** Hydrogenase sophistication. *Nature*, **397**,214-215.
- Cammack, R. & Sykes, A. G. (1999)** Advances In Inorganic Chemistry: Iron Sulfur Proteins, Vol. 47.
- Carell, T., Burgdorf, L. T., Kundu, L. M. & Cichon, M. (2001)** The mechanism of action of DNA photolyases. *Curr Opin Chem Biol*, **5**,491-498.
- Cline, J. D. (1969)** Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **14**, 454-458.

-
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. & Farrow, J. A. (1994)** The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol*, **44**,812-826.
- Cook, G. M., Wells, J. E. & Russell, J. B. (1994)** Ability of *Acidaminococcus fermentans* to oxidize trans-aconitate and decrease the accumulation of tricarballoylate, a toxic end product of ruminal fermentation. *Appl Environ Microbiol*, **60**,2533-2537.
- Crofts, A. R., Hong, S., Zhang, Z. & Berry, E. A. (1999)** Physicochemical aspects of the movement of the rieske iron sulfur protein during quinol oxidation by the bc(1) complex from mitochondria and photosynthetic bacteria. *Biochemistry*, **38**,15827-15839.
- Cunningham, R. P., Asahara, H., Bank, J. F., Scholes, C. P., Salerno, J. C., Surerus, K., Munck, E., McCracken, J., Peisach, J. & Emptage, M. H. (1989)** Endonuclease III is an iron-sulfur protein. *Biochemistry*, **28**,4450-4455.
- Dickert, S., Pierik, A. J., Linder, D. & Buckel, W. (2000)** The involvement of coenzyme A esters in the dehydration of (*R*)-phenyllactate to (*E*)-cinnamate by *Clostridium sporogenes*. *Eur J Biochem*, **267**,3874-3884.
- Dus, K., De Klerk, H., Sletten, K. & Bartsch, R. G. (1967)** Chemical characterization of high potential iron proteins from *Chromatium* and *Rhodopseudomonas gelatinosa*. *Biochim Biophys Acta*, **140**,291-311.
- Dutscho, R., Wohlfarth, G., Buckel, P. & Buckel, W. (1989)** Cloning and sequencing of the genes of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Eur J Biochem*, **181**,741-746.
- Duyvis, M. G., Wassink, H. & Haaker, H. (1996)** Formation and characterization of a transition state complex of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *FEBS Letters*, **380**, 233-236.
- Edmondson, D. E. & Tollin, G. (1983)** Semiquinone formation in flavo- and metalloflavoproteins. *Top Curr Chem*, **108**,109-138.
- Eikmanns, U. & Buckel, W. (1990)** Properties of 5-hydroxyvalerate CoA-transferase from *Clostridium aminovalericum*. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **371**,1077-1082.

-
- Emptage, M. H., Dreyers, J. L., Kennedy, M. C. & Beinert, H. (1983)** Optical and EPR characterization of different species of active and inactive aconitase. *J Biol Chem*, **258**,11106-11111.
- Evans, E. H. & Crofts, A. R. (1974)** In situ characterisation of photosynthetic electron transport in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Biochim Biophys Acta*, **357**,89-102.
- Every, D. & Skerman, T. M. (1980)** Ultrastructure of the *Bacteroides nodosus* cell envelope layers and surface. *J Bacteriol*, **141**,845-857.
- Fish, W. W. (1988)** Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol*. **158**, 661-668.
- Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J. & Rees, D. C. (1992)** Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science*, **257**,1653-1659.
- Ghisla, S. & Massey, V. (1989)** Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur J Biochem*, **181**,1-17.
- Gladyshev, V. N. & Lecchi, P. (1995)** Identification of molybdopterin in molybdenum- and selenium-containing enzymes. *Biofactors*, **5**,93-97.
- Grossman, J. G., Hasnain, S. S., Yousafzai, F. K., Smith, B. E., Eady, R. R., Schindelin, H., Kisker, C., Howard, J. G., Tsuruta, H., Muller, J. & Rees, D. C. (1999)** Comparing crystallographic and solution structures of nitrogenase complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55 (Pt 4)**,727-728.
- Gruber, K. & Kratky, C. (2002)** Coenzyme B(12) dependent glutamate mutase. *Curr Opin Chem Biol*, **6**,598-603.
- Hans, M., Buckel, W. & Bill, E. (2000)** The iron-sulfur clusters in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. Biochemical and spectroscopic investigations. *Eur J Biochem*, **267**,7082-7093.
- Hans, M., Bill, E., Cirpus, I., Pierik, A. J., Hetzel, M., Alber, D. & Buckel, W. (2002)** Adenosine triphosphate-induced electron transfer in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Biochemistry*, **41**,5873-5882.
- Henninger, T., Anemuller, S., Fitz-Gibbon, S., Miller, J. H., Schafer, G. & Schmidt, C. L. (1999)** A novel Rieske iron-sulfur protein from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*: sequencing of the

-
- gene, expression in *E. coli* and characterization of the protein. *J Bioenerg Biomembr*, **31**,119-128.
- Higuchi, Y., Yagi, T. & Yasuoka, N. (1997)** Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure*, **5**,1671-1680.
- Hofmeister, A. E., Albracht, S. P. & Buckel, W. (1994)** Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity. *FEBS Lett*, **351**,416-418.
- Horler, D. F., McConnell, W. B. & Westlake, D. W. (1966)** Glutaconic acid, a product of the fermentation of glutamic acid by *Peptococcus aerogenes*. *Can J Microbiol*, **12**,1247-1252.
- Horler, D. F., Westlake, D. W. & McConnell, W. B. (1966)** Conversion of glutamic acid to volatile acids by *Micrococcus aerogenes*. *Can J Microbiol*, **12**,47-53.
- Huynh, B. H. & Kent, T. A. (1984)** Mossbauer studies of iron proteins. *Adv Inorg Biochem*, **6**,163-223.
- Immhoff-Struckle, D. & Pfennig, N. (1983)** Isolation and characterization of a nicotinic acid-degrading sulfate reducing bacterium, *Desulfococcus niacini*, sp. nov. *Arch. Microbiol.* **136**, 194-198.
- Iwata, S., Saynovits, M., Link, T. A. & Michel, H. (1996)** Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome *bcl* complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure*, **4**,567-579.
- Johnson, J. L. (1988)** Analysis of Metals [29] Molybdenum. *Methods of Enzymology*, Vol. **158**, 371-382.
- Kennedy, M. C., Emptage, M. H., Dreyer, J. L. & Beinert, H. (1983)** The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J Biol Chem*, **258**,11098-11105.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H. & Kiley, P. J. (1997)** Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**,6087-6092.
- Kim, J., Woo, D. & Rees, D. C. (1993)** X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution. *Biochemistry*, **32**,7104-7115.

-
- Klees, A. G., Linder, D. & Buckel, W. (1992)** 2-Hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Fusobacterium nucleatum* (subsp. *nucleatum*): an iron-sulfur flavoprotein. *Arch Microbiol*, **158**,294-301.
- Kaneuchi, C. (1973)** Isolation method of anaerobic bacteria by glove box procedure. *Kansenshogaku Zasshi*, **47**,125-130.
- Kuchta, R. D. & Abeles, R. H. (1985)** Lactate reduction in *Clostridium propionicum*. Purification and properties of lactyl-CoA dehydratase. *J Biol Chem*, **260**,13181-13189.
- Kuchta, R. D., Hanson, G. R., Holmquist, B. & Abeles, R. H. (1986)** Fe-S centers in lactyl-CoA dehydratase. *Biochemistry*, **25**,7301-7307.
- Kuila, D. & Fee, J. A. (1986)** Evidence for a redox-linked ionizable group associated with the [2Fe-2S] cluster of Thermus Rieske protein. *J Biol Chem*, **261**,2768-2771.
- Kuo, C. F., McRee, D. E., Fisher, C. L., O'Handley, S. F., Cunningham, R. P. & Tainer, J. A. (1992)** Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III. *Science*, **258**,434-440.
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lanzilotta, W. N., Holz, R. C. & Seefeldt, L. C. (1995)** Proton NMR investigation of the [4Fe-4S]¹⁺ cluster environment of nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*: defining nucleotide-induced conformational changes. *Biochemistry*, **34**,15646-15653.
- Lanzilotta, W. N. & Seefeldt, L. C. (1996)** Electron transfer from the nitrogenase iron protein to the [8Fe-(7/8)S] clusters of the molybdenum-iron protein. *Biochemistry*, **35**,16770-16776.
- Lanzilotta, W. N., Fisher, K. & Seefeldt, L. C. (1996)** Evidence for electron transfer from the nitrogenase iron protein to the molybdenum-iron protein without MgATP hydrolysis: characterization of a tight protein-protein complex. *Biochemistry*, **35**,7188-7196.
- Laukel, M., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E. & Vorholt, J. A. (2003)** The tungsten-containing formate dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1: purification and properties. *Eur J Biochem*, **270**,325-333.

-
- Lazcano, A. & Bada, J. L. (2003)** The 1953 Stanley L. Miller experiment: fifty years of prebiotic organic chemistry. *Orig Life Evol Biosph*, **33**,235-242.
- Link, T. A. & Iwata, S. (1996)** Functional implications of the structure of the 'Rieske' iron-sulfur protein of bovine heart mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Biochim Biophys Acta*, **1275**,54-60.
- Link, T. A., Saynovits, M., Assmann, C., Iwata, S., Ohnishi, T. & von Jagow, G. (1996)** Isolation, characterisation and crystallisation of a watersoluble fragment of the Rieske iron-sulfur protein of bovine heart mitochondrial bc₁ complex. *Eur. J. Biochem.* **237**, 71-75.
- Locher, K. P., Hans, M., Yeh, A. P., Schmid, B., Buckel, W. & Rees, D. C. (2001)** Crystal structure of the *Acidaminococcus fermentans* 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase component A. *J Mol Biol*, **307**,297-308.
- Lode, E. T. & Coon, M. J. (1971)** Enzymatic omega-oxidation. V. Forms of *Pseudomonas oleovorans* rubredoxin containing one or two iron atoms: structure and function in omega-hydroxylation. *J Biol Chem*, **246**,791-802.
- Mason, J. R. & Cammack, R. (1992)** The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu Rev Microbiol*, **46**,277-305.
- Meckenstock, R. U., Krieger, R., Ensign, S., Kroneck, P. M. & Schink, B. (1999)** Acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*. Molecular and spectroscopic properties of the tungsten iron-sulfur enzyme. *Eur J Biochem*, **264**,176-182.
- Meighen, E. A. & Dunlap, P. V. (1993)** Physiological, biochemical and genetic control of bacterial bioluminescence. *Adv Microb Physiol*, **34**,1-67.
- Meighen, E. A. (1993)** Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *Faseb J*, **7**,1016-22.
- Müller, F. (1983)** The flavin redox-system and its biological function. *Top Curr Chem*, **108**,71-107.
- Müller, U. & Buckel, W. (1995)** Activation of (R)-2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Eur J Biochem*, **230**,698-704.
- Onate, Y. A., Vollmer, S. J., Switzer, R. L. & Johnson, M. K. (1989)** Spectroscopic characterization of the iron-sulfur cluster in *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J Biol Chem*, **264**,18386-18391.

-
- Otaka, E. & Ooi, T. (1989)** Examination of protein sequence homologies: V. New perspectives on evolution between bacterial and chloroplast-type ferredoxins inferred from sequence evidence. *J Mol Evol*, **29**,246-254.
- Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A. & Deisenhofer, J. (1995)** Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science*, **268**,1866-1872.
- Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A. & Albracht, S. P. (1999)** Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, Biology's way to activate H₂. *J Biol Chem*, **274**,3331-3337.
- Popescu, C. V., Bates, D. M., Beinert, H., Munck, E. & Kiley, P. J. (1998)** Mossbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**,13431-13435.
- Rees, D. C. & Howard, J. B. (1999)** Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. *J Mol Biol*, **293**,343-350.
- Reitzer, R., Krasser, M., Jogl, G., Buckel, W., Bothe, H. & Kratky, C. (1998)** Crystallization and preliminary X-ray analysis of recombinant glutamate mutase and of the isolated component S from *Clostridium cochlearium*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54 (Pt 5)**,1039-1042.
- Renner, K. A. & Howard, J. B. (1996)** Aluminum fluoride inhibition of nitrogenase: stabilization of a nucleotide-Fe-protein-MoFe-protein complex. *Biochemistry*, **35**,5353-5358.
- Rogosa, M. (1969)** *Acidaminococcus* gen. n., *Acidaminococcus fermentans* sp. n., anaerobic gram-negative diplococci using amino acids as the sole energy source for growth. *J Bacteriol*, **98**,756-766.
- Rouault, T. A. & Klausner, R. D. (1996)** Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron. *Trends Biochem Sci*, **21**,174-177.
- Rouault, T. A. & Klausner, R. D. (1996)** The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism. *Exs*, **77**,183-197.
- Rypniewski, W. R., Breiter, D. R., Benning, M. M., Wesenberg, G., Oh, B. H., Markley, J. L., Rayment, I. & Holden, H. M. (1991)** Crystallization and structure determination to 2.5-Å resolution of the oxidized [2Fe-2S] ferredoxin isolated from *Anabaena* 7120. *Biochemistry*, **30**,4126-4131.

-
- Scherf, U. & Buckel, W. (1993)** Purification and properties of an iron-sulfur and FAD-containing 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-CoA delta 3-delta 2-isomerase from *Clostridium aminobutyricum*. *Eur J Biochem*, **215**,421-429.
- Scherf, U., Sohling, B., Gottschalk, G., Linder, D. & Buckel, W. (1994)** Succinate-ethanol fermentation in *Clostridium kluyveri*: purification and characterisation of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-CoA delta 3-delta 2-isomerase. *Arch Microbiol*, **161**,239-45,
- Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J. L., Howard, J. B. & Rees, D. C. (1997)** Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature*, **387**,370-376.
- Schweiger, G., Dutscho, R. & Buckel, W. (1987)** Purification of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. An iron-sulfur protein. *Eur J Biochem*, **169**,441-448.
- Simonsen, R. P. & Tollin, G. (1980)** Structure-function relations in flavodoxins. *Mol Cell Biochem*, **33**,13-24.
- Smith, B. E. & Eady, R. R. (1992)** Metalloclusters of the nitrogenases. *Eur J Biochem*, **205**,1-15.
- Smith, D. M., Buckel, W. & Zipse, H. (2003)** Deprotonation of enoxy radicals: theoretical validation of a 50-year-old mechanistic proposal. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**,1867-1870.
- Soriano, G. M., Ponamarev, M. V., Carrell, C. J., Xia, D., Smith, J. L. & Cramer, W. A. (1999)** Comparison of the cytochrome *bcl* complex with the anticipated structure of the cytochrome *b6f* complex: Le plus ca change le plus c'est la meme chose. *J Bioenerg Biomembr*, **31**,201-213.
- Switzer, R. L. (1989)** Non-redox roles for iron-sulfur clusters in enzymes. *Biofactors*, **2**,77-86.
- Thamer, W., Cirpus, I., Hans, M., Pierik, A. J., Selmer, T., Bill, E., Linder, D. & Buckel, W. (2003)** A two [4Fe-4S]-cluster-containing ferredoxin as an alternative electron donor for 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Arch Microbiol*, **179**,197-204.
- Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C. (1995)** Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, **373**,580-587.

-
- Wächtershauser, G. (1988)** Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiol Rev*, **52**,452-484.
- Wächtershauser, G. (1992)** Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog Biophys Mol Biol*, **58**,85-201.
- Willadsen, P. & Buckel, W. (1990)** Assay of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*. *FEMS Microbiol Lett*, **58**,187-191.

Dank

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und vor allem Motivation. Ich danke ihm für die intensive Unterstützung in der Phase der Stagnation dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rolf Thauer danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen sowie für die Möglichkeit, das EPR-Gerät als auch das AAS jederzeit nutzen zu können.

Herrn Dr. Holger Dobbek und Dr. Berta Martins danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Kristallisation der Komponente D und des Komplexes. Sowie Herrn Dr. Messerschmidt für die Möglichkeit, diese Experimente in seinem Labor im MPI Martinsried durchführen zu können.

Herrn Dr. Antonio Pierik für seine sagenhafte Bereitschaft, immer ein Hilfs- und Diskussionspartner zu sein. Dank auch für die Messung der EPR-Experimente.

Herrn Jihoe Kim gilt mein besonderer Dank für die sehr gute und fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen dieser Arbeit. Eine Menge Spass auf dem Basketballcourt hat diese Zusammenarbeit weiter gestärkt.

Der Arbeitsgruppe Buckel und Bremer danke ich für die nette Atmosphäre.

Meiner Familie.

Persönliche Daten

Name, Vorname	Hetzel, Marc (geb. Munschek)
Straße	Bettenweg 8
PLZ/Wohnort:	35043 Marburg
Geburtsdatum/-ort	16.04.1972 in Dernbach/Ww
Familienstand	Verheiratet
Kinder	keine
Nationalität/Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1984-1988	Staatliches Mons-Tabor Gymnasium, Montabaur
1988-1990	Realschule Montabaur Mittlere Reife, Note 2.0
1990-1993	Staatliches Peter-Altmeier Gymnasium Montabaur, Allgemeine Hochschulreife, Note 1.7
1993-1999	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
1999 (02-10)	Diplomarbeit im Laboratorium für biochemische Mikrobiologie unter Leitung von Prof. Dr. W. Buckel Titel der Abschlussarbeit: Propionyl-CoA dehydrogenase von <i>Clostridium propionicum</i> , Note 1.8
Seit Dezember	
1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Laboratorium für Mikrobiologie bei Prof. Dr. W. Buckel

1.1.1 Besondere Kenntnisse

Sprachkenntnisse	deutsch, englisch, französisch
EDV-Kenntnisse	Grundlagenkenntnisse als Systemadministrator für Windows NT 4.0, Windows 2000, MS Office
Hobbies	Basketball, Literatur

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Zum Mechanismus der 2-Hydroxyglutaryl-CoA Dehydratase aus *Clostridium*
symbiosum

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die vorliegende Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen deutschen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)